#1330

2:040404

studii și cercetări de biochimie

1

TOMUL 27

1984

IANUARIE — IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 27, nr. 1, p. 1—106, 1984, București

SCBIAS 27 (1), 1984

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

În țară, abonamentele se fac la oficiile poștale.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P. O. Box 136—137, telex 11226, 79517 — București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, P. O. Box 2—2, 78200 — București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

TOMUL 27, NR. 1 1984

IANUARIE—IUNIE

S U M A R

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Acţiunea toxică a plumbului asupra creierului de şobolan adult şi pui 3

DANIELA ANDREI, LUCIA BUZILĂ, EUGENIA PANDELE, Metodă de obţinere simultană a principalelor componente active din colostrul uman 8

VLAD ARTENIE, COSTICĂ MISĂILĂ, Bioritmul activităţii α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu (*Salmo gairdneri* Rich.) 16

FLORICA CHELU, Determinarea cantitativă a componentelor principale din lacrimi 20

VICTORIA DOBRE, VL. GHEORDUNESCU, Caracterizarea unor preparate de lecitină din gălbenuş de ou 29

MARGARETA DUMITRESCU, H. D. SCHELL, LUCIA BUZILĂ, TR. BENŢIA, Izolarea unei proteine din teaca de mazăre (*Pisum sativum*) cu efect reglator asupra peroxidazei din hrean 33

I. F. DUMITRU, DANA IORDĂCHESCU, DIANA DINU, B. SOW, Distribuţia unor enzime la nivelul diferitelor segmente ale tractului digestiv de cobai 39

ELENA GANEA, RODICA BÎRNESCU, Interacţiuni de tip proteină-proteină între subunităţile componente ale factorului de creştere a nervului 49

CORNELIA MIHAI, Parametri enzimatici ai celulelor hepatice provenite de la şoareci purtători de carcinom Lewis 57

G. NEAMŢU, I. CĂBULEA, C. BOTEZ, GH. ILLYES, FL. IRIMIE, Cercetări biochimice asupra carotenoidelor din porumb. II. Conţinutul pigmenţilor carotenoidici din porumb diploid normal şi opaque-2 şi din porumb dihaploid . . 63

RADU OLINESCU, GH. IONIŢĂ, NORA PASCU, NICOLAE MOCANU, Modificări biochimice produse în urma efortului muscular la sportivi 70

DOINA OŞIANU, ELENA NICOARĂ, Cercetări privind metabolismul carotenoidic la păsări. I. Metabolismul carotenoidic la puii broiler. 76

DOINA OŞIANU, ELENA NICOARĂ, Cercetări privind metabolismul carotenoidic la păsări. II. Metabolismul carotenoidic al găinilor ouătoare 81

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂŢEANU, TR. BENŢIA, Studiul comportării unor derivaţi noi ai alcoolului polivinilic reticulat ca suport insolubil pentru imobilizări de enzime 85

ANCA ROŞEANU, ILEANA DINU, MAGDALENA LUNGU, N. PREDA, S. VASU, Cercetări privind caracterizarea biochimică şi biologică a unui preparat lactazic obţinut din *Aspergillus niger* 92

OAMENII DE ŞTIINŢĂ ŞI PACEA 97

RECENZII 99

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

TOME 27, N° 1 1984

JANUARY—JUNE

CONTENTS

ZOE ANCA, SILVIA GABOR, Toxic action of lead on the brain of adult and young rats 3

DANIELA ANDREI, LUCIA BUZILĂ, EUGENIA PANDELE, A method for the simultaneous isolation of the main active components from the human colostrum 8

VLAD ARTENIE, COSTICĂ MISĂILĂ, The biorhythm of the intestinal α-amylase activity in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) 16

FLORICA CHELU, Quantitative determination of the main components in tears . . 20

VICTORIA DOBRE, VL. GHEORDUNESCU, The characterization of some egg yolk lecithin preparations 29

MARGARETA DUMITRESCU, H. D. SCHELL, LUCIA BUZILĂ, TR. BENŢIA, Isolierung eines Proteins aus Erbsenschoten (*Pisum sativum*) mit Wirkung auf die Meerrettig-Peroxidase 33

I. F. DUMITRU, DANA IORDĂCHESCU, DIANA DINU, B. SOW, Distribution of some enzymes in various segments of the guinea pig digestive tract 39

ELENA GANEA, RODICA BÎRNESCU, Protein-protein interactions between 7S NGF subunits 49

CORNELIA MIHAI, Enzymic parameters of hepatic cells from Lewis carcinoma host mice 57

G. NEAMŢU, I. CĂBULEA, C. BOTEZ, GH. ILLYES, FL. IRIMIE, Biochemical researches of carotenoids in maize. II. Content of carotenoid pigments in normal diploid maize, in opaque-2 maize and in dihaploid maize 63

RADU OLINESCU, GH. IONIŢĂ, NORA PASCU, NICOLAE MOCANU, Biochemical modifications following physical exercise in sportsmen 70

DOINA OŞIANU, ELENA NICOARĂ, Studies on the carotenoids metabolism in poultry. I. The carotenoids metabolism in broilers 76

DOINA OŞIANU, ELENA NICOARĂ, Studies on the carotenoids metabolism in poultry. II. The carotenoids metabolism of laying hens 81

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂŢEANU, TR. BENŢIA, Untersuchung des verhaltens einiger Derivate des vernetzten polyvinylalkohols als Träger zur Immobilisierung von Enzymen 85

ANCA ROŞEANU, ILEANA DINU, MAGDALENA LUNGU, N. PREDA, S. VASU, Biochemical and biological studies on *Aspergillus niger* lactase preparation . . 92

LES HOMMES DE SCIENCE ET LA PAIX 97

COMPTES RENDUS 99

ACȚIUNEA TOXICĂ A PLUMBULUI ASUPRA CREIERULUI DE ȘOBOLAN ADULT ȘI PUI

ZOE ANCA, SILVIA GABOR

Rezumat. Șobolani femele care alăptează au primit 200 ppm plumb, ca acetat, intragastric în apa de băut timp de 4 săptămîni.
S-au măsurat conținutul acidului piruvic, activitatea colinesterazei din creier, glucoza și colinesteraza din sînge la șobolan adult și în perioada de alăptare. Rezultatele obținute au evidențiat sensibilitatea crescută a creierului șobolanilor în perioada de alăptare la efectele toxice ale plumbului, manifestată prin creșterea nivelului hexokinazei, inhibarea activității colinesterazei și o creștere a concentrației acidului piruvic.
Nu s-au evidențiat modificări semnificative în creierul șobolanilor femele adulte expuse la tratamente cu plumb în comparație cu animalele netratate.

Observațiile pe om, precum și studiile experimentale pe animale au arătat că inhalarea cronică sau ingestia de plumb duc la modificări importante în funcția sistemului nervos central și periferic (1), (2), (3). Simptomatologia afectării neurologice în intoxicația cronică cu plumb se manifestă prin iritabilitate, tremor, oboseală, slăbirea memoriei, insomnii sau somnolență, hiperactivitate etc. (4).

Se subliniază că efectele neurotoxice ale plumbului sînt diferite la organismul matur și în dezvoltare, datorită unor particularități morfofiziologice ale creierului în decursul proceselor de maturare (5). Se apreciază că sensibilitatea crescută a creierului imatur față de acțiunea toxică a plumbului s-ar datora unei slabe dezvoltări a proceselor energometabolice, precum și permeabilității excesive a barierei hematoencefalice (6). Observațiile diferiților autori arată de asemenea că toxicitatea crescută a plumbului la organismele tinere ar fi rezultanta unei absorbții intestinale crescute a acestui metal, consecința incompletei dezvoltări a celulelor epiteliale gastrointestinale (7). Astfel, la șobolanul adult, 5—10% din plumbul ingerat este absorbit la nivel intestinal, pe cînd la șobolanii nou-născuți absorbția este foarte mare, 60% din plumbul prezent în laptele de mamă fiind reținut de către pui (7), (8).

În lucrarea prezentă ne-am propus să investigăm efectul administrării subcronice de acetat de plumb asupra unor parametri biochimici din creierul de șobolan adult și pui.

MATERIAL ȘI METODE

Experimentul s-a efectuat pe două loturi de animale, și anume : a) șobolani femele adulte, în greutate de 160—180 g, care au primit zilnic intragastric, timp de 4 săptămîni, acetat de plumb în concentrație de 200 ppm, respectiv apă de robinet pentru animalele martor ;

b) şobolani pui, care au primit plumb prin laptele de mamă folosindu-se următorul procedeu experimental : şobolani mame, în prima zi după naştere, ţinute în cuşti separate împreună cu cîte 8 pui, au primit zilnic prin sondă intragastrică 200 ppm acetat de plumb, timp de 4 săptămîni. Şobolanilor mamă martor li s-a administrat prin acelaşi procedeu apă de robinet. S-a urmărit săptămînal greutatea corporală a animalelor adulte şi a puilor.

Sacrificarea animalelor s-a făcut prin decapitare, creierul fiind rapid prelevat, imersat în ser fiziologic răcit la 5°C, cîntărit şi pregătit în vederea următoarelor determinări :

— glicemie, glucozodependenţa fiind o caracteristică metabolică a creierului ;

— activitatea hexokinazică a creierului (9), ca indicator al gradului de metabolizare a glucozei penetrate din sînge în creier, activitatea acestei enzime fiind independentă de controlul insulinei ;

— acidul piruvic (10) din creier, ca produs intermediar al glicolizei anaerobe, furnizor important de grupare acetil, necesară pentru sinteza acetilcolinei şi a acizilor graşi ;

— activitatea acetilcolinesterazei din sînge şi creier (11), ca indicator al funcţionalităţii sistemului de neurotransmisie colinergic.

S-a lucrat pe omogenat total de creier, care a fost suspendat în soluţie tampon fosfat, pH 7,4, folosindu-se o concentraţie de 10% omogenat pentru determinarea activităţii hexokinazei şi acidului piruvic şi o concentraţie de 5% omogenat pentru determinarea colinesterazei din creier.

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic, folosindu-se media aritmetică ($\bar{x}$), abaterea standard (σ) şi modificările procentuale faţă de animalele martor (%).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Începînd cu prima săptămînă de administrare a plumbului, greutatea corporală a femelelor adulte şi puilor a prezentat o scădere semnificativă, dependentă şi de durata de administrare (fig. 1).

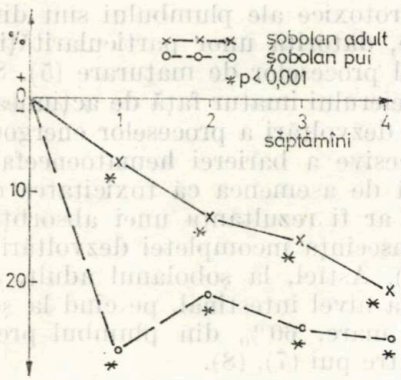


Fig. 1. — Greutatea corporală a şobolanilor adulţi şi pui intoxicaţi cu plumb, urmărită săptămînal.

La pui, scăderea cea mai accentuată s-a constatat după prima săptămînă de ingerare a plumbului. Se remarcă faptul că puii au prezentat întîrzieri mult mai pronunţate în creştere comparativ cu şobolanii adulţi, ceea ce confirmă susceptibilitatea crescută a organismului în dezvoltare la acţiunea toxică a plumbului.

Retardarea în sporul de greutate sub acţiunea plumbului, observată şi de alţi autori, este explicată ca fiind consecinţa mai multor factori ca deprivare de hrană (cînd plumbul este administrat în alimente), furnizare insuficientă de lapte de la mamă sau efectul toxic direct al plumbului ingerat asupra dezvoltării puilor (12), (13), (14), (15).

Se cunoaște că sursa energetică principală pentru creier este glucoza provenită din sînge și că între absorbția glucozei de către creier și activitatea hexokinazei există un paralelism, hexokinaza avînd un rol important în transportul glucozei spre creier prin bariera hematoencefalică.

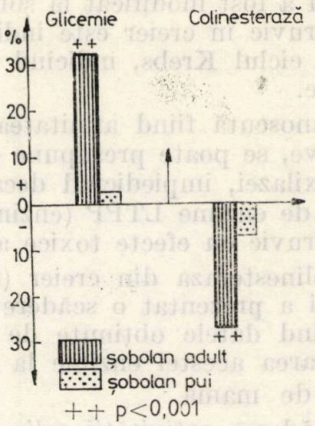


Fig. 2. — Glicemia și colinesteraza din sînge la șobolani adulți și pui intoxicați cu plumb.

După cum reiese din figura 2, glicemia este semnificativ crescută la șobolanii adulți și nemodificată la șobolanii pui. Date proprii și ale altor autori au evidențiat efectul hiperglicemiant al plumbului administrat în diverse condiții experimentale (16). Această hiperglicemie a fost pusă în legătură cu afectarea pancreasului (scăderea numărului de insule Langerhans) și hiperfuncția glandelor suprarenale.

Colinesteraza sanguină (fig. 2) a fost scăzută la șobolanii adulți. La pui, activitatea acestei enzime nu a fost inhibată în sînge. Modificări ale activității colinesterazei din sînge au fost obținute și de alți autori la om sau în experiment pe animale (17), (18), (19), (20), (21).

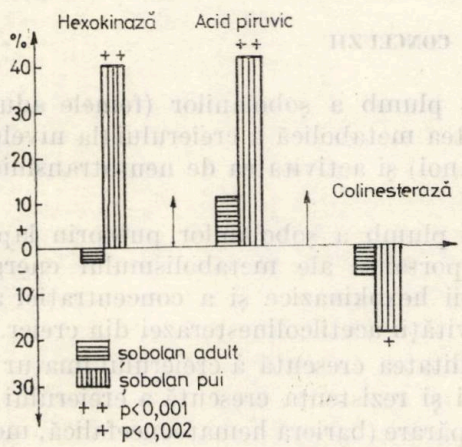


Fig. 3. — Activitatea hexokinazei și a colinesterazei și concentrația acidului piruvic din creierul de șobolani adulți și pui intoxicați cu plumb.

Activitatea hexokinazică (fig. 3) a fost găsită nemodificată la șobolanii adulți; în schimb, la șobolanii pui a prezentat creșteri semnificative. Creșterea activității hexokinazei evidențiază o intensificare a proceselor

de metabolizare a glucozei, urmare a unui consum energetic crescut, cauzat de starea de hiperactivitate descrisă de mulţi autori în intoxicaţia cu plumb (17), (20).

Acidul piruvic (fig. 3) a fost crescut semnificativ în creierul puilor şi nu a fost modificat la şobolanii adulţi. Creşterea concentraţiei acidului piruvic în creier este indiciul unei metabolizări incomplete a glucozei în ciclul Krebs, indicînd în acelaşi timp o accentuare a glicolizei anaerobe.

Cunoscută fiind afinitatea crescută a plumbului pentru grupările tiol active, se poate presupune că plumbul acţionează la nivelul piruvat-decarboxilazei, împiedicînd decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic, dirijată de enzime LTPP (enzimă SH), ducînd astfel la acumularea acidului piruvic cu efecte toxice asupra celulei nervoase (21).

Colinesteraza din creier (fig. 3) a fost nemodificată la şobolanii adulţi şi a prezentat o scădere semnificativă la pui, rezultatele noastre confirmînd datele obţinute de Silbergeld şi Goldberg (17) cu privire la afectarea acestei enzime la şobolanii pui intoxicaţi cu plumb prin laptele de mamă.

Scăderea activităţii colinesterazei din creier reflectă efectul neurotoxic al plumbului la nivelul sistemului de neurotransmisie colinergic.

Analizînd comparativ efectul intoxicaţiei cronice cu plumb la şobolan adult şi pui, se remarcă faptul că şobolanul adult nu prezintă modificări ale parametrilor biochimici investigaţi la nivel de sistem nervos central, modificările colinesterazei din sînge indicînd o afectare a sistemului de neurotransmisie colinergic periferic.

La pui însă, leziunile biochimice din creier au fost evidente şi subliniază sensibilitatea crescută a creierului în dezvoltare în expunerea cronică la plumb.

CONCLUZII

1. Expunerea cronică la plumb a şobolanilor (femele adulte) nu afectează semnificativ activitatea metabolică a creierului (la nivelul parametrilor biochimici studiaţi de noi) şi activitatea de neurotransmisie colinergică.

2. Expunerea cronică la plumb a şobolanilor pui prin laptele de mamă duce la modificări importante ale metabolismului energetic al creierului (creştere a activităţii hexokinazice şi a concentraţiei acidului piruvic) şi la o inhibare a activităţii acetilcolinesterazei din creier.

3. Se evidenţiază sensibilitatea crescută a creierului imatur la efectele neurotoxice ale plumbului şi rezistenţa crescută a creierului matur, asigurată de unele sisteme de apărare (bariera hematoencefalică, mecanism de excreţie etc.).

Prezentat la redacţie
la 22 iulie 1982

Institutul de igienă şi sănătate publică
Cluj-Napoca, str. Pasteur nr. 6

TOXIC ACTION OF LEAD ON THE BRAIN OF ADULT AND YOUNG RATS

SUMMARY

Lacting female rats have received 200 ppm lead as acetate intragastrically in the drinking water for 4 weeks.

The pyruvic acid content, the cholinesterase activity in the brain, as well as glucose and cholinesterase in the blood were determined in adult and lactating rats.

The results obtained proved the increased sensibility to the lead toxic effects on the brain of lactating rats, shown by the increase of the hexokinase level, the inhibition of cholinesterase activity and an increase of the pyruvic acid concentration.

No significant changes were observed in the brain of adult female rats exposed to lead in comparison with the untreated animals.

BIBLIOGRAFIE

1. D. M. SETTLE, C. C. PATTERSEN, Science, **207**, 1167 (1980).
2. P. DAVID, J. CLARK, K. VOELLER, Lancet, **2**, 900 (1972).
3. J. A. MICHAELSON, M. W. SAUERHOFF, Environ. Hlth Perspect., **7**, 201 (1974).
4. J. RUTH LILIS, J. EISINGER, W. E. BLUMBLEY, Int. Occup., **41**, 217 (1978).
5. M. DAS, R. DIXIT, P. SETH, H. MUKHAN, J. Neurochem., **36**, *4*, 1439 (1981).
6. H. WIEGAND, Umwelthygiene, Jahresberichte, **12**, 59 (1979).
7. G. B. FORBES, J. C. REINA, J. Nutrit., **102**, 647 (1972).
8. J. SIMINIVIC, M. PISONIC, Nature (London), **233**, 564 (1971).
9. H. U. BERGMEYER, *Methods of enzymatic analysis*, Academic Press, New York — London, 1963, p. 788.
10. B. KOHN, R. H. MIRSKY, Science, **106**, 148 (1947).
11. R. TRUHAUST, H. VERAIN, Ann. Biol. Chim., **22**, *3—4*, 414 (1964).
12. A. PENTSHIEW, F. GARRO, Acta neuropath., **6**, 266 (1966).
13. J. A. THOMAS, F. D. DALLENBACH, M. THOMAS, Virchow's Arch. Path. Anat., **352**, 61 (1971).
14. H. S. MAKER, G. M. LEHRER, D. J. SILDES, Env. Res., **10**, 76 (1975).
15. A. T. MODAK, S. T. WEINTRAUB, W. B. STAVINOHA, Toxicol. Appl. Pharmac., **34**, 340 (1975).
16. Z. ANCA, S. GABOR, St. cerc. biochim., **24**, 127 (1981).
17. E. N. SILBERGELD, A. M. GOLDBERG, Neuropathology, **14**, 431 (1978).
18. A. De BRIAN, Arch. Env. Hlth, **23**, 249 (1971).
19. K. KOSTIAL, V. B. VOUK, Toxicol. Appl. Pharmac., **12**, 219 (1957).
20. A. T. MODAK, W. B. STAVINOHA, Pharmacology, **21**, 209 (1978).
21. I. MANTA, *Biochimie medicală*, Edit. didactică și pedagogică, București, 1965, p. 189.

METODĂ DE OBȚINERE SIMULTANĂ A PRINCIPALELOR COMPONENTE ACTIVE DIN COLOSTRUL UMAN

DANIELA ANDREI, LUCIA BUZILĂ, EUGENIA PANDELE

Rezumat. S-a urmărit realizarea unei metode de obținere simultană a imunoglobulinei A secretoare (SIgA), a componentei secretoare (SC), a lactoferinei și a lactoperoxidazei.
Metoda se bazează pe cromatografia de schimb ionic și pe gel-filtrare, folosind întreaga cantitate de colostru luată în experiență.
Identificarea componentelor s-a făcut prin dublă difuzie, prin disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă și prin determinări de activitate enzimatică.
Metoda permite izolarea principalelor componente active din colostru cu randamente comparabile cu cele din literatură.

Proprietățile antiinfecțioase și antivirale ale laptelui uman se datoresc atît sistemului imun, reprezentat în principal de SIgA, cît și unor componente cum sînt lizozimul, lactoferina sau lactoperoxidaza. Studierea acestor componente a impus separarea și purificarea lor. În acest scop s-au întrebuințat metode specifice, metoda Parry pentru lizozim (1), metoda Got pentru lactoferină (Lf) (2), metoda Newcomb (3) modificată de Mestecky pentru imunoglobulina A secretoare (SIgA) (4) și metodele Groves și Morrison pentru lactoperoxidază (LPO) (5), (6).

Ne-am propus să combinăm metodele menționate pentru a putea obține simultan cît mai multe componente din aceeași cantitate de colostru.

S-a pornit de la separarea prin cromatografie pe DEAE-celuloză a colostrului delipidat și decazeinizat (3), (4), întrebuințîndu-se toate cele patru fracțiuni obținute. Acestea au fost prelucrate ulterior prin combinarea cromatografiei pe CM-celuloză cu gel-filtrare pe Sepharose 6 B sau Ultrogel AcA_{22}. În felul acesta s-au separat și purificat SIgA, SC, lactoferina și lactoperoxidaza.

MATERIAL ȘI METODE

Colostrul din primele șase zile post-partum, furnizat de maternitatea Clinicii de ginecologie a Spitalului Caritas — București, a fost centrifugat 1 oră la 20 000 rpm, la 4°C, obținîndu-se trei straturi.

Stratul mijlociu a fost colectat și adus la pH 4,2 cu acid acetic 2% pentru decazeinificare. Îndepărtarea precipitatului s-a făcut prin centrifugarea probelor la 20 000 rpm, 1 oră, la 4°C. Supernatantul a fost neutralizat prin dializă față de tampon fosfat 0,01 M, pH 8,0.

Cromatografia pe DEAE-celuloză s-a făcut în gradient discontinuu de NaCl între 0,03 și 0,1 M, pe o coloană de 3/31 cm, echilibrată cu tampon fosfat 0,01 M, pH 8,0. Viteza de eluție a fost de 60—67 ml/oră, colectîndu-se fracțiuni de 5 ml.

Cromatografia pe CM-celuloză a primei fracţiuni rezultate de pe DEAE-celuloză, pentru izolarea lactoperoxidazei, a fost făcută după metoda dată de Hogg şi Jago (7). Coloana a avut dimensiunile de 2/30 cm. Eluţia s-a făcut cu tampon acetat 0,01 M, pH 5,7, faţă de care proba a fost în prealabil dializată. După eluţie s-a aplicat un tampon acetat 0,05 M, pH 5,7 şi apoi un tampon acetat 0,05 M, pH 5,7 + NaCl 0,2 M. Viteza de eluţie a fost de 34 ml/oră. S-au colectat probe de cîte 5 ml. Probele au fost citite la 280 nm pentru proteină şi la 420 nm pentru activitate enzimatică. Concentrarea fracţiunii cu lactoperoxidază s-a făcut la Amicon pe membrana PM 30.

Cromatografia pe Ultrogel AcA_{22} a fracţiunii II, obţinută de pe DEAE-celuloză, pentru separarea lactoferinei, a fost făcută în tampon Tris-HCl 0,02 M, pH 7,4, utilizînd o coloană de 2/100 cm. Viteza de eluţie a fost de 10 ml/oră, colectîndu-se fracţiuni de 3 ml.

Cromatografia pe Sepharose 6 B a fracţiunii IV de pe DEAE-celuloză pentru purificarea SIgA a fost făcută în tampon Tris-HCl 0,05 M + NaCl 0,2 M + EDTA 0,002 M. Coloana a avut dimensiunile de 2,5/95 cm; viteza de eluţie a fost de 24 ml /oră, colectîndu-se fracţiuni de 3 ml.

Dubla difuzie Ouchterlony (8) s-a utilizat pentru punerea în evidenţă a SIgA, lactoferinei şi componentei secretoare.

Prepararea antiserurilor antilactoferina, anti-SIgA şi anti-SC a fost făcută pe iepuri după o metodă descrisă anterior (9).

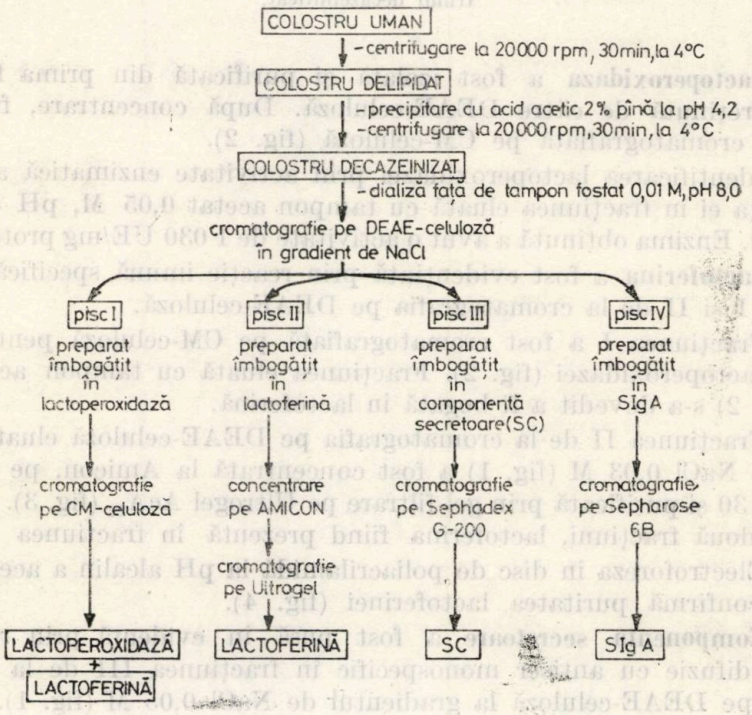
Determinarea activităţii lactoperoxidazei s-a făcut după metoda Maehly (10).

Concentraţiile proteice au fost determinate prin metoda Lowry (11).

Dise-electroforeza în gel de poliacrilamidă (PAA) la pH alcalin a fost făcută după Davis (12).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Metoda de obţinere simultană a principalelor componente active din colostrul uman este prezentată în schema următoare:



Prima etapă de separare a fost cromatografia pe DEAE-celuloză a colostrului decazeinificat (fig. 1), obţinîndu-se patru fracţiuni. Prin prelucrarea lor ulterioară s-au purificat cele patru componente: lactoperoxidaza, lactoferina, SC şi SIgA.

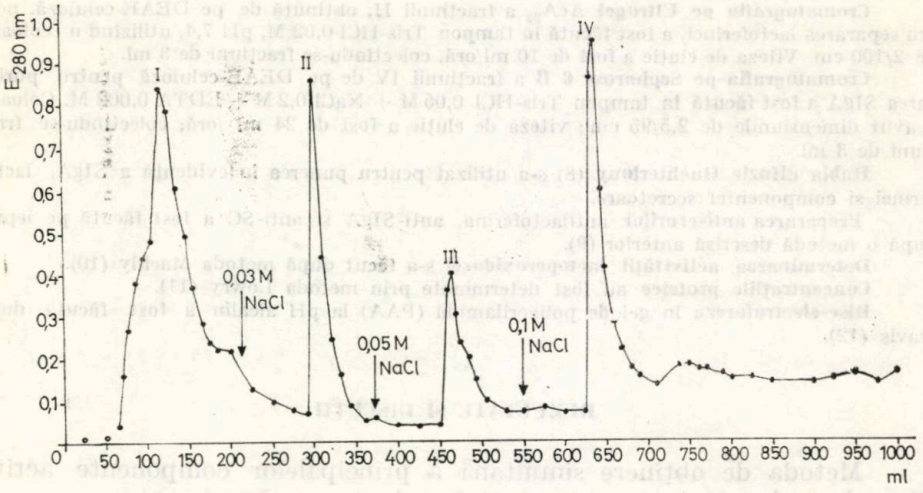


Fig. 1. — Cromatografia pe DEAE-celuloză în gradient discontinuu de NaCl a colostrului decazeinificat.

Lactoperoxidaza a fost izolată şi purificată din prima fracţiune, cea nereţinută de către DEAE-celuloză. După concentrare, fracţiunea a fost cromatografiată pe CM-celuloză (fig. 2).

Identificarea lactoperoxidazei prin activitate enzimatică a dovedit prezenţa ei în fracţiunea eluată cu tampon acetat 0,05 M, pH 5,7 + 0,2 M NaCl. Enzima obţinută a avut o activitate de 1 030 UE/mg proteină/min.

Lactoferina a fost evidenţiată prin reacţie imună specifică în fracţiunile I şi II de la cromatografia pe DEAE-celuloză.

Fracţiunea I a fost cromatografiată pe CM-celuloză pentru separarea lactoperoxidazei (fig. 2). Fracţiunea eluată cu tampon acetat 0,05 M (fig. 2) s-a dovedit a fi bogată în lactoferină.

Fracţiunea II de la cromatografia pe DEAE-celuloză eluată la gradientul NaCl 0,03 M (fig. 1) a fost concentrată la Amicon, pe membrana PM 30 şi purificată prin gel-filtrare pe Ultrogel AcA_{22} (fig. 3). S-au obţinut două fracţiuni, lactoferina fiind prezentă în fracţiunea II.

Electroforeza în disc de poliacrilamidă la pH alcalin a acestei fracţiuni confirmă puritatea lactoferinei (fig. 4).

Componenta secretoare a fost pusă în evidenţă prin reacţie de dublă difuzie cu antiser monospecific în fracţiunea III de la cromatografia pe DEAE-celuloză la gradientul de NaCl 0,05 M (fig. 1).

Imunoglobulina A secretoare, conținută în fracțiunea IV la gradii entul de NaCl 0,1 M a cromatografiei pe DEAE-celuloză (fig. 1), identificată prin reacția de dublă difuzie, a fost purificată prin două trecer-

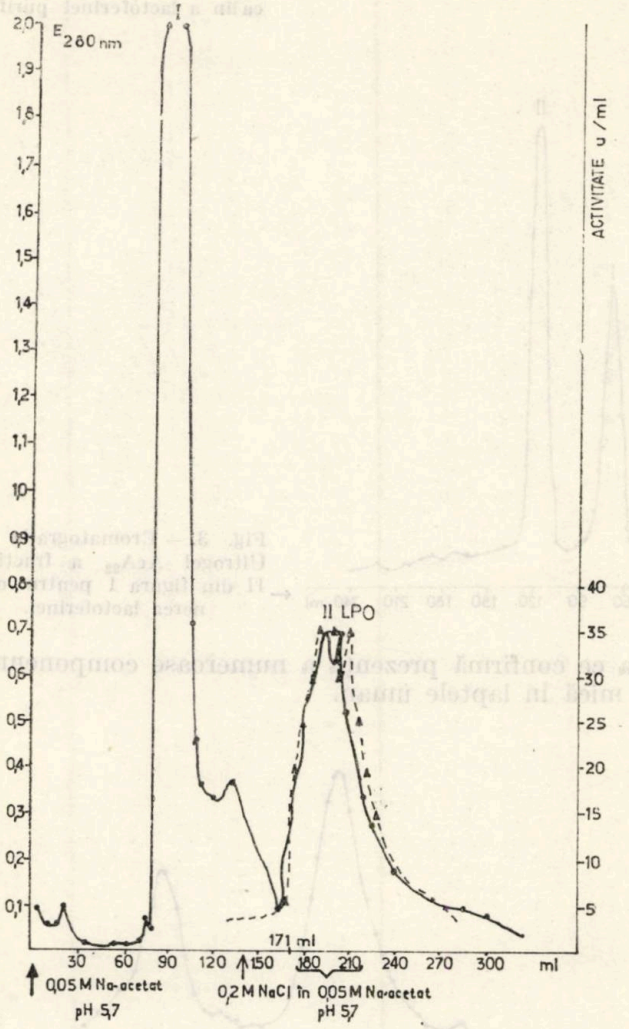

I
II LPO
E 280 nm
ACTIVITATE u / ml
171 ml
30 60 90 120 150 180 210 240 270 300 ml
0,05 M Na-acetat pH 5,7
0,2 M NaCl în 0,05 M Na-acetat pH 5,7

Fig. 2. — Cromatografia pe CM-celuloză a fracțiunii I din figura 1 pentru obținerea lactoperoxidazei.

succesive pe Sepharose 6 B. Serul imun evidențiază SIgA în fracțiunea II (fig. 5).

Randamentele de obținere a fiecărei componente sînt prezentate în tabela 1.

Concentrația proteică a colostrului delipidat a fost de 7 300 mg $^0/_{00}$, diferența față de 6 800 mg $^0/_{00}$ (nr. 1) fiind dată de cazeină. Dializa

prelungită a colostrului decazeinificat, necesară cromatografiei pe DEAE-celuloză, duce la o pierdere de aproape 60% din concentraţia proteică

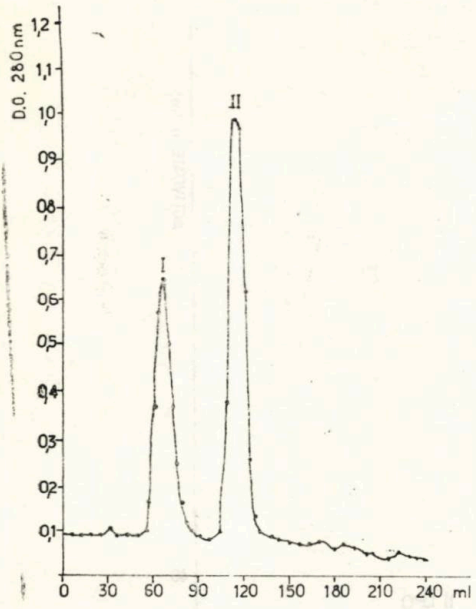
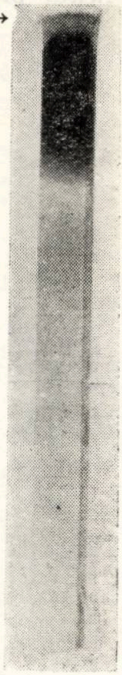


Fig. 3. — Cromatografia pe Ultrogel AcA_{22} a fracţiunii II din figura 1 pentru obţinerea lactoferinei.

Fig. 4. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă la pH alcalin a lactoferinei purificate



(nr. 2), ceea ce confirmă prezenţa a numeroase componente cu greutate moleculară mică în laptele uman.

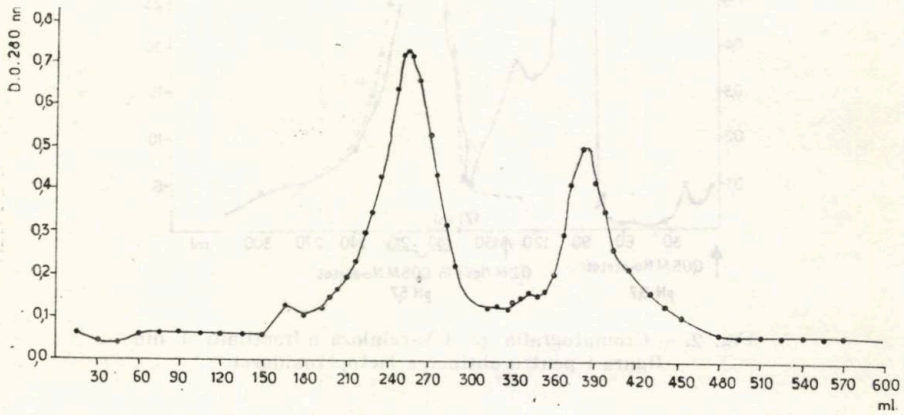


Fig. 5. — Cromatografia pe Sepharose 6 B a fracţiunii IV din figura 1 pentru obţinerea SIgA.

După separarea şi purificarea prin celelalte etape (nr. 3—11) s-au obţinut 600 mg $^0/_{00}$ imunoglobulina A secretoare, 150 mg $^0/_{00}$ componentă secretoare, 1 mg $^0/_{00}$ lactoperoxidază şi 442 mg $^0/_{00}$ lactoferină, ceea ce

Tabela 1

Componentele active obținute din colostru uman (mg/1 000 ml)

Nr. crt.	Produsul	Conc. prot. (mg/ 1 000 ml)	Procente față de nr. crt.			
			1	3	4	6
1	Colostru delipidat și decazeinificat	6800	100			
2	Colostru delipidat, decazeinificat și dializat	2900	42,6			
3	Fracțiunea I de la cromatografia pe DEAE-celuloză	640	9,4			
4	Fracțiunea II de la cromatografia pe DEAE-celuloză	312	5			
5	Fracțiunea III de la cromatografia pe DEAE-celuloză (SC)	150	2,2			
6	Fracțiunea IV de la cromatografia pe DEAE-celuloză (SIgA)	672	10			
7	Produs obținut după gel-filtrare pe Sepharose 6 B a fracțiunii IV de pe DEAE-celuloză (SIgA)	600	9			82
8	Lactoperoxidaza obținută la cromatografia pe CM-celuloză a fracțiunii I de pe DEAE-celuloză	1,04	0,015	0,16		
9	Lactoferina obținută la cromatografia pe CM-celuloză a fracțiunii I de pe DEAE-celuloză	300	4,3	47		
10	Lactoferina obținută la cromatografia pe Ultrogel a fracțiunii II de pe DEAE-celuloză	142	2,08		46	
11	Total lactoferină din 9 și 10	442	6,4			

reprezintă 9%, 2%, 0,01% și, respectiv, 6,4% din cantitatea totală de proteine a colostrului delipidat și decazeinificat.

Randamentele de obținere față de fracțiunile separate în prima etapă prin cromatografie pe DEAE-celuloză sînt prezentate de asemenea în tabela 1. Astfel se obțin 82% imunoglobulina A secretoare din fracțiunea IV (nr. 7), 0,16% lactoperoxidază din fracțiunea I (nr. 8) și 47% lactoferină din aceeași fracțiune (nr. 9). Lactoferina se obține în proporție de 46% și din fracțiunea II (nr. 10).

Compararea randamentelor de obținere a componentelor cu cele menționate de alți autori (13), (14), (15) este prezentată în tabela 2.

Pentru imunoglobulina A secretoare, randamentul de 9% poate fi considerat optim. Unii autori ajung pînă la un randament de 50%, deoarece se opresc la prima etapă de purificare. Prin cromatografii repetate pe Sepharose, randamentul de obținere se reduce în favoarea purificării avansate a preparatului.

Tabela 2

Randamentul de obţinere a componentelor din 1 000 ml colostru uman prin metoda utilizată comparativ cu datele din literatură (13), (14), (15)

Nr. crt. din tabela 1	Produsul	Conc. prot. (mg)	% componentă prin metoda utilizată	% componentă prin metoda din literatură	Randamentul metodei faţă de cel citat de alţi autori*
1	Colostru decazeinificat	6800	100		
7	SIgA purificată	600	9	9	100%
8	Lactoperoxidaza	1,04	0,015	0,02	75%
11	Lactoferina	442	6,4	13	50%

* Datele din această coloană au fost calculate faţă de un colostru martor cu o concentraţie proteică totală de 23 g/l (13).

Randamentul obţinut la separarea lactoperoxidazei se încadrează în limitele apropiate celor din literatură.

Procentul de 6,4, obţinut pentru lactoferină, reprezintă doar 50% din datele publicate în literatură. Acest rezultat impune găsirea unei metode selective pentru creşterea randamentului de obţinere a lactoferinei.

CONCLUZII

Metoda realizată permite separarea optimă a imunoglobulinei A secretoare, a componentei secretoare şi a lactoperoxidazei.

Randamentul de obţinere a lactoferinei este de numai 50% faţă de datele din literatură.

Metoda s-a dovedit eficientă prin valorificarea integrală a cantităţii de colostru folosite.

Prezentat la redacţie
la 6 decembrie 1983

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

A METHOD FOR THE SIMULTANEOUS ISOLATION OF THE MAIN ACTIVE COMPONENTS FROM THE HUMAN COLOSTRUM

SUMMARY

A method for the simultaneous isolation of the following: SIgA, a secretory component (SC), lactoferrin and lactoperoxidase was established. It is based on the ionic exchange chromatography and gel-filtration, using the whole batch of colostrum. The components were identified by double radial diffusion, disc-electrophoresis in polyacrylamide

gel and enzyme activity determinations. The method allows the isolation of the main active components from the colostrum with yields similar to those obtained by the procedures already published.

BIBLIOGRAFIE

1. R. M. PARRY Jr., H. C. CHANDAN, K. M. SHAHANI, Arch. Biochem. Biophys., **130**, 59 (1969).
2. R. GOT, Clin. chim. Acta, **11**, 132 (1965).
3. R. W. NEWCOMB, D. NORMANSELL, D. R. STANDWORTH, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
4. J. MESTECKY, R. KULHAVY, F. W. KRAUS, J. Immunol., **108**, 738 (1972).
5. M. L. GROVES, Biochim. biophys. Acta, **100**, 154 (1965).
6. M. MORRISON, D. E. HULTQUIST, J. Biol. Chem., **238**, 2847 (1963).
7. D. C. McHOGG, G. R. JAGO, Biochem. J., **117**, 779 (1970).
8. O. OUCHTERLONY, Acta path. scand., **32**, 231 (1953).
9. L. BUZILĂ, C. MOTAȘ, St. cerc. biochim., **22**, 3 (1979).
10. A. C. MAEHLY, in *Methods of biochemical analysis*, sub red. DAVID GLYCK, vol. I, Academic Press, New York — London, 1961, p. 358.
11. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR, R. J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1961).
12. B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
13. M. GEORMĂNEANU, I. GHERGHINA, *Imunitatea și bolile imunitare la copii*, Edit. medicală, București, 1983, p. 55.
14. A. S. GOLDMAN, C. GARZA, B. L. NICHOLS, R. M. GOLDBLUM, J. Pediatr., **100**, 4 (1982).
15. D. J. LEWIS-JONES, G. J. REYNOLDS, Acta paediatr. scand., **72**, 13 (1983).

BIORITMUL ACTIVITĂȚII α-AMILAZEI INTESTINALE LA PĂSTRĂVUL CURCUBEU (*SALMO GAIRDNERI* RICH.)

VLAD ARTENIE*, COSTICĂ MISĂILĂ**

Rezumat. Activitatea α-amilazei din intestinul păstrăvului curcubeu, crescut în viviere și furajat cu hrană concentrată, prezintă un ritm circadian și sezonal. În luna iulie, activitatea enzimei este maximă la orele 12 și 03 și minimă la orele 24 și 06. În luna august, ritmul circadian al activității α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu înregistrează trei maxime (la orele 12, 18 și 03) și două minime (la orele 15 și 06—09). După o inaniție de 72 de ore, activitatea α-amilazei intestinale, de asemenea, își păstrează caracterul ritmic. Valorile activității enzimei în luna iulie sînt de aproximativ două ori mai mari decît cele din luna august.

Multe procese metabolice și funcții fiziologice specifice organismului animal prezintă un caracter ritmic, ele avînd intensități variabile la intervale de timp determinate. Unul din cele mai importante ritmuri biologice este ritmul circadian, care s-a evidențiat pentru numeroase sisteme enzimatice, ca, de exemplu, glicogen-sintetază (1), (2), glicogen-fosforilază (3), α-amilaza sanguină (4), unele enzime implicate în metabolismul colesterolului (5), (6), tirozin-aminotransferaza hepatică (7), biosinteza proteinelor (8) etc.

În reacțiile de adaptare a organismului animal la condițiile schimbătoare ale mediului exterior, un rol deosebit joacă aparatul digestiv, în particular enzimele participante la procesul de digestie, hrana fiind supusă în primul rînd acțiunii acestor enzime.

Lucrarea de față se referă la ritmul circadian și sezonal al activității α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu (*Salmo gairdneri* Rich.), crescut în condiții de acvacultură intensivă, în viviere.

MATERIAL ȘI METODĂ

Ca material biologic s-a folosit păstrăvul curcubeu (*Salmo gairdneri* Rich.), în vîrstă de un an (P_1).

Activitatea α-amilazei intestinale s-a cercetat la pești furajați normal cu hrană concentrată (9) și la pești nefurajați trei zile înainte de prelevarea probelor. Pentru analize s-a prelevat segmentul intestinal imediat următor stomacului, cu conținutul său. Extracția enzimei s-a efectuat prin mojararea țesutului prelevat cu apă distilată (1 g/10 ml), urmată de centrifugare la rece. În supernatantul obținut s-a determinat activitatea α-amilazei după metoda cu acid 3,5-dinitrosalicilic (10), folosind ca substrat o soluție de amidon 2% în tampon fosfat 0,01 M, pH 7,4. Activitatea α-amilazei s-a exprimat în micromoli maltoză/minut/g țesut umed.

Activitatea α-amilazei intestinale s-a urmărit la intervale de 3 ore, timp de 24 de ore și în două perioade diferite (iulie și august 1980).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cercetările noastre arată că activitatea α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu, crescut în condiții intensive, în viviere, înregistrează valori oscilante pe parcursul a 24 de ore.

În urma determinărilor din luna iulie rezultă că activitatea α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu furajat (fig. 1, curba A) este mai ridicată ziua, de la orele 9 pînă la orele 18, cu o valoare maximă la orele 12. În cursul nopții, activitatea α-amilazei scade, fiind minimă în jurul orelor 24 (35,33% din valoarea maximă). Spre orele 03 se constată o ușoară creștere a activității enzimei, reprezentînd 60,80% din valoarea maximă de la orele 12. Al doilea maxim al activității α-amilazei intestinale este urmat de o nouă scădere, mai puțin accentuată, la orele 06 (43,39% din valoarea primului maxim).

La peștii supuși inaniției timp de 72 de ore, activitatea α-amilazei intestinale, de asemenea, își păstrează caracterul ritmic, avînd un maxim ce se întinde de la orele 15 la orele 24 (fig. 1, curba B), cu valoarea cea mai ridicată la orele 18, reprezentînd 27,42% din activitatea maximă a

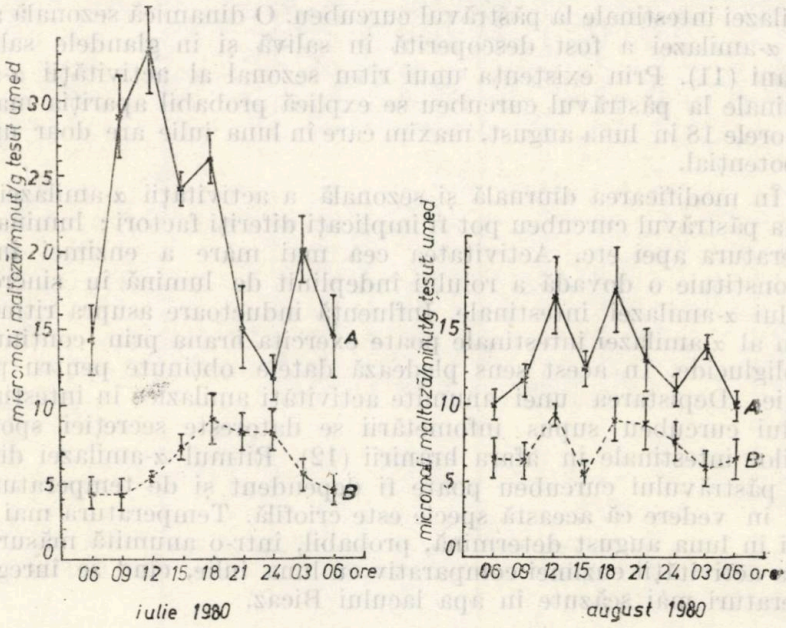


Fig. 1. — Ritmul circadian al activității α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu în lunile iulie și august 1980, în condiții normale de furajare (curba A) și în inaniție (curba B). Pentru fiecare punct de pe grafic s-au efectuat șase determinări paralele.

enzimei evidențiată la peștii furajați. Deci, maximul activității amilazice la păstrăvul curcubeu nefurajat este defazat cu 6 ore față de cel constatat la lotul furajat.

Datele obținute în luna august relevă că activitatea α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu manifestă o ritmicitate diurnă asemănătoare cu cea observată în luna iulie. În cazul păstrăvului curcubeu fura-

jat (fig. 1, curba A), ritmul circadian al activității α-amilazei intestinale prezintă trei maxime și două minime. Primele două maxime sînt de aceeași amplitudine și se situează la orele 12 și 18, iar al treilea maxim, cu o amplitudine mai redusă (79,15% din valoarea maximă a activității enzimei în luna august), la orele 03. Minimele activității enzimei se evidențiază la orele 15 și 06—09.

Activitatea α-amilazei din intestinul păstrăvului curcubeu supus inaniției prezintă un maxim la orele 12 și un minim la orele 15. Ele reprezintă 53,78% și, respectiv, 31,27% din valoarea maximă a enzimei găsite în luna august la peștii furajați.

Din datele noastre reiese că activitatea α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu în lunile iulie și august are, în general, o dinamică asemănătoare. Între ritmurile activității enzimei studiate în cele două luni există totuși unele diferențe cantitative. Astfel, activitatea maximă a α-amilazei în luna august este de 52,68% din valoarea maximă determinată în luna iulie. În mod corespunzător, și minimele activității enzimei la peștii sacrificați în luna august sînt mai coborîte valoric decît în luna iulie. Aceste diferențe dovedesc o variație sezonală a activității α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu. O dinamică sezonală a activității α-amilazei a fost descoperită în salivă și în glandele salivare la șobolani (11). Prin existența unui ritm sezonal al activității α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu se explică probabil apariția maximului de la orele 18 în luna august, maxim care în luna iulie are doar un caracter potențial.

În modificarea diurnală și sezonală a activității α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu pot fi implicați diferiți factori: lumina, hrana, temperatura apei etc. Activitatea cea mai mare a enzimei în timpul zilei constituie o dovadă a rolului îndeplinit de lumină în sincronizarea ritmului α-amilazei intestinale. Influență inductoare asupra ritmului circadian al α-amilazei intestinale poate exercita hrana prin conținutul său de poliglucide. În acest sens pledează datele obținute pentru peștii în inaniție. Depistarea unei anumite activități amilazice în intestinul păstrăvului curcubeu supus înfometării se datorește secreției spontane a sucurilor intestinale în afara hrănirii (12). Ritmul α-amilazei din intestinul păstrăvului curcubeu poate fi dependent și de temperatura apei, avînd în vedere că această specie este criofilă. Temperatura mai ridicată a apei în luna august determină, probabil, într-o anumită măsură diminuarea activității enzimei comparativ cu luna iulie, cînd se înregistrează temperaturi mai scăzute în apa lacului Bicaz.

CONCLUZII

1. Activitatea α-amilazei din intestinul păstrăvului curcubeu, crescut în viviere și furajat cu hrană concentrată, prezintă un ritm circadian și sezonal.

2. În luna iulie, activitatea α-amilazei intestinale la păstrăvul curcubeu este maximă la orele 12 și 03 și minimă la orele 24 și 06. În luna august, ritmul circadian al activității enzimei înregistrează trei maxime (la orele 12, 18 și 03) și două minime (la orele 15 și 06—09).

3. După o inaniție de 72 de ore, activitatea α-amilazei intestinale își păstrează caracterul ritmic.

4. Activitatea α-amilazei în luna iulie este de aproximativ două ori mai mare decît cea din luna august.

Prezentat la redacție
la 27 octombrie 1983

* *Universitatea „Al. I. Cuza", Iași, Disciplina de biochimie*
și
** *Stațiunea de cercetare și producție salmonicolă Potoci, jud. Neamț*

THE BIORHYTHM OF THE INTESTINAL α-AMYLASE ACTIVITY IN THE RAINBOW TROUT (*SALMO GAIRDNERI* RICH.)

SUMMARY

The α-amylase activity in the intestine of the rainbow trout, raised in superintensive conditions, presents a circadian and seasonal rhythm. In July the enzyme activity is maximum at 12 a.m. and 3 a.m. and minimum at 12 p.m. and 6 a.m. În August there are three maximum values (at 12 a.m., 6 p.m. and 3 a.m.) and two minimum values (3 p.m. and 6—9 a.m.) of the circadian rhythm of the intestinal α-amylase activity in the rainbow trout. Even after 72 hours of starvation the intestinal α-amylase activity maintains its rhythmical character.

In July the values of α-amylase activity are approximately twice higher than those recorded in August.

BIBLIOGRAFIE

1. E. L. BOCKMAN, D. K. MEYER, F. A. PURDY, Amer. J. Physiol., **221**, 383 (1971).
2. P. McVERRY, KI-HAN KIM, Biochem. Biophys. Res. Commun., **46**, 1242 (1972).
3. I. SAFFE de VILCHEZ, S. LOBARBO, C. A. VILCHEZ, Enzyme, **13**, 240 (1972).
4. VL. ARTENIE, V. HEFCO, Ann. științ. Univ. Iași, Secțiunea II a. Biologie, **24**, 130 (1978).
5. R. E. DUGAN, L. L. SLAKEY, A. V. BRIEDIS, J. W. PORTER, Arch. Biochem. Biophys., **152**, 21 (1972).
6. K. A. MITROPOULOS, S. BALASUBRAMANIAN, G. F. GIBBONS, B. E. A. REEVES, FEBS Lett., **27**, 203 (1972).
7. I. B. BLACK, J. AXELROD, Proc. natl. Acad. Sci., U. S., **61**, 1287 (1968).
8. C. OBLED, M. ARNAL, G. FAUCONNESU, C. R. Soc. Biol., **166**, 885 (1973).
9. K. W. BATTES, C. MISĂILĂ, VL. ARTENIE, Brevet invenție R. S. România nr. 68 344/1976.
10. G. NOELTING, P. BERNFELD, Helv. chim. Acta, **31**, 286 (1948).
11. A. P. LEVITSKII, R. D. BARABASH, V. M. KONOVEȚ, *Biohimiceskaja evoliutija*, Izd-vo „Nauka", Leningrad, 1973, p. 192.
12. K. F. SORVACEV, *Osnovi biohimii pitanija rib*, Izd-vo „Legkaia i pișcevaia promîșlennosti", Moskva, 1982, p. 22.

DETERMINAREA CANTITATIVĂ A COMPONENTELOR PRINCIPALE DIN LACRIMI

FLORICA CHELU

Rezumat. S-au determinat cantitativ următoarele componente din lacrimi : imunoglobulina A secretoare (SIgA), componenta secretoare (SC), IgA, IgG, lactoferina, lizozimul și albumina. Ca metode s-au folosit difuzia radială în gel, imunoelectroforeza încrucișată, disc-electroforeza în gel de PAA în mediu alcalin și acid. Prin difuzie radială s-au obținut următoarele rezultate : SIgA 45,57 mg%, SC 34,75 mg%, IgA 19,38 mg%, IgG 20 mg%, albumină 5,7 mg% și lactoferină 120 mg%. Lizozimul a prezentat o activitate litică de 5,9 mg/ml. Prin electroforeză încrucișată s-a pus în evidență prezența, pe lîngă SIgA, a IgA monomer de tip seric și a SC libere. Corelarea dintre cantitatea totală de proteine, profilul separării electroforetice atît în mediul alcalin cît și în mediul acid și cantitatea fiecărei componente a demonstrat preponderența în lacrimi a proteinelor bazice, ca lizozimul și lactoferina. Este discutată implicarea acestor componente, ca și cea a sistemului imun secretor, în activitatea antiinfecțioasă a lacrimilor.

Studiul lacrimilor a atras pe cercetători încă din anii '20 ai acestui secol; astfel, Fleming (1) a arătat prezența lizozimului în lacrimi. Odată cu evoluția mijloacelor de investigare, au fost cercetate intens și alte componente proteice (2), (3) din lacrimi, nu numai lizozimul (4), (5). Prezența caracteristică a SIgA la nivelul mucoaselor a determinat studierea compoziției în factori imuni și a lacrimilor, mai ales în diferite stări patologice ale ochiului (6), (7), (8), (9), (10), (11). Cercetările s-au extins și asupra imunoglobulinelor din țesuturile ochiului (12), (13).

În ceea ce privește rolul antiinfecțios al componentelor din lacrimi, datorită keratitei herpetice recidivante, cercetările s-au concentrat pe imunoglobulinele cu rol de anticorpi neutralizanți ai virusurilor (14), (15), (16).

În lucrarea prezentă ne-am propus să corelăm între ele cantitățile diferitelor componente din lacrimi, deoarece este cunoscută implicarea în apărarea locală atît a sistemului imun specific, reprezentat de SIgA, cît și a altor componente imune și neimune, ca IgG, lactoferină, lizozim etc.

În acest scop, am determinat cantitativ următoarele componente din lacrimi : SIgA, IgA, IgG, SC, lactoferina, lizozimul, albumina, precum și proteinele totale, corelînd cantitățile cu profilul separării lor electroforetice.

MATERIAL ȘI METODE

Pentru stabilirea valorilor s-au întrebuințat lacrimi individuale de la militari în termen (bunăvoința Spitalului militar central, catedra de oftalmologie, I.M.F.), precum și de la colege de laborator, prin stimularea secreției cu ceapă sau hrean.

S-a lucrat cu o micropipetă de 20 μl, cu care s-au colectat lacrimile prin capilaritate.

Concentrația proteică s-a determinat prin metoda Lowry (17).

Dubla difuzie radială (18) s-a practicat în gel de agaroză 1% în ser fiziologic cu serurile imune specifice.

Determinarea cantitativă a componentelor din lacrimi s-a realizat prin metodele de imunodifuzie radială (19), (20). Difuzia s-a făcut pe plăci în agaroză 1%, conținînd fiecare serurile imune specifice în proporție de 1/20. După 48 de ore, plăcile se spală în ser fiziologic, se usucă și se colorează cu Amidoblack 1%. Diametrul inelului de precipitare este proporțional cu concentrația antigenului din godeu.

Curbele etalon s-au realizat cu preparatele purificate de noi (SIgA, SC, IgA, IgG și lactoferină) și cu albumină serică umană Serva, în concentrații între 0,05 și 2 mg/ml, și s-au trasat în sistem semilogaritmic, avînd pe abscisă diametrul inelului de precipitare în mm și pe ordonată logaritmul concentrației proteice.

În vederea preparării serurilor imune monospecifice anti-IgA, anti-SC, antilactoferină, componentele respective au fost izolate și purificate din colostru uman.

Prepararea SIgA și a SC s-a făcut după metoda preconizată de Newcomb și colab. (21), cu unele modificări efectuate de Mestecky și colab. (22).

Lactoferina s-a obținut după metoda Got (23).

Pentru determinarea IgA și IgG s-au întrebuințat serurile imune de la Institutul „Dr. I. Cantacuzino" din București.

Determinarea activității litice a lizozimului prin difuzie radială în gel (24) s-a realizat pe plăci de agar 1%, în care s-a înglobat *Micrococcus lysodeikticus* ca substrat. Diametrele se citesc după 16 ore de difuzie. Activitatea litică se evaluează pe curba etalon stabilită cu lizozim din albuș de ou, exprimîndu-se în μg/ml de lizozim din albuș.

Electroforeza încrucișată s-a practicat după metoda Ganrot (25), folosindu-se migrarea electroforetică a proteinelor în gel de agaroză 1% în tampon veronal pH 8,2, urmată de o migrare pe aceeași placă în gel de agaroză 1%, care conține serul imun în proporție de 1/20. Plăcile menținute peste noapte în camera umedă sînt spălate și colorate cu Amidoblack 1%.

Electroforeza în PAA la pH acid pentru separarea proteinelor bazice s-a realizat, după Reisfeld și colab. (26), în tampon alanină de pH 4,5, cu 3 mA/tub, timp de 2 ore și 30 min.

Electroforeza în PAA la pH alcalin s-a practicat, după Davis (27), în tampon Tris/glicocol pH 8,8 cu 1 mA/tub, timp de 1—2 ore.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Proteine totale. Concentrația proteică a fiecărei probe este prezentată în tabela 1.

Concentrația proteică a lacrimilor s-a determinat de către alți autori prin diferite metode, atît pe probe ca atare, cît și concentrate (2), (3), recoltate de la același individ (8) sau amestecuri (pooluri). În cazul probelor individuale, autorii prezintă o medie de 8,10 mg/ml, cu valori între 3,6 și 12,6 mg/ml.

Rezultatele noastre indică o medie a concentrației proteice mult mai joasă, de 4,07 mg/ml, cu valori ce variază între 2,45 și 5,75 mg/ml. S-ar putea ca aceste valori să fie mai scăzute datorită procesului de stimulare prin traumă blîndă, care conduce la diluarea lacrimilor (6).

Imunoglobulina A. Prin întrebuințarea serului imun anti-IgA seric se obține o medie de 19,38 mg%, cu valori ce oscilează între 10,5 și 32 mg%. Aceste date se integrează între cele prezentate de alți autori (tabela 2).

Din rezultatele prezentate în tabela 2 este de menționat că nu se obțin întotdeauna valori egale pentru ambii ochi la aceeași persoană (6) sau că valorile mediei cresc de la 17 la 25 mg% (8) sau scad de la 38 la 21 mg% (6).

Tabela 1

Compoziția lacrimilor de la persoane normale

Nr. crt.	Numele	Disc-electroforeză	IgA (mg%)	IgG (mg%)	Albumină (mg%)	Lactoferină (mg%)	SIgA (mg%)	SC (mg%)	Proteine (mg%)	Lizozim (mg/ml)
1	P.I.	* (1) ** (10)	19,0	200,0	—	—	40,0	45,0	365	2,72
2	P.M.	** (11)	23,0	200,0	—	—	48,0	50,0	445	4,6
3	A.R.	* (5) ** (7)	17,0	62,0	—	—	33,0	28,5	495	4,6
4	B.V.	* (4) ** (6)	14,5	—	—	—	33,0	28,5	463	6,0
5	U.I.		23,0	—	—	—	40,0	12,5	340	6,0
6	F.C.		—	—	—	—	—	—	357	—
7	N.I.		—	—	—	—	—	—	385	4,6 4,0
8	S.R.		—	—	—	—	—	—	330	4,0 4,6
9	C.E.		16,5	20,5	—	—	69,0	12,5	390	—
10	M.S.		23,0	—	—	—	82,0	19,0	375	—
11	P.N.	** (8)	—	—	—	—	—	—	245	10,0
12	B.C.		—	—	—	—	—	—	575	—
13	O.L.		—	—	—	—	—	—	505	10,0
14	N.P.	* (3)	—	—	—	—	—	—	340	7,2
15	P.N.	** (8)	—	14,5	—	—	—	—	495	—
16	M.M.	* (2)	10,5	14,5	—	—	33,5	0	—	0,4
17	X	** (9)	—	—	—	—	41,0	—	—	21,6
18	C.B.		12,0	—	—	—	—	0	—	—
19	C.G.		—	28,0	—	—	—	6,5	—	—
20	B.C.		—	28,0	—	—	—	—	—	—
21	N.C.		32,0	—	3,0	160	6,8	95,0	—	—
22	N.O.		14,5	—	5,0	160	—	—	—	—
23	I.V.		23,5	—	5,4	123	—	37,5	—	—
24	B.M.		23,5	—	9,0	92	—	37,5	—	—
25	M.F.		—	—	4,6	105	—	—	—	—
26	A.A.		—	—	4,6	123	—	—	—	—
27	P.I.		—	—	10,5	105	—	—	—	—
28	M.P.		—	—	5,4	123	—	—	—	—
29	N.O.		—	—	9,0	—	—	78,0	—	—
30	I.M.		—	—	4,6	54	41,5	—	—	—
31	S.D.		—	14,5	4,6	70	41,5	26,5	—	—
32	I.M.		—	—	3,3	123	—	—	—	—
33	S.V.		—	—	3,9	200	48,0	—	—	—
			19,38	20	5,7	120	45,57	34,75	407	5,9

Notă. * = mediu acid ; ** = mediu alcalin.

Electroforeza încrucișată cu serul imun anti-IgA relevă un clopot mare de precipitare în dreptul migrării IgA seric (2), (3) și o linie de precipitare la start în dreptul SIgA (fig. 1), aspect care indică categoric prezența IgA monomer, de tip seric, în lacrimi.

Componenta secretoare a fost determinată prin întrebuințarea serului imun monospecific. Rezultatele prezentate în tabela 1 indică o medie de 34,75 mg%, cu valori ce variază între 6,5 și 78 mg%. Această concentrație mare a SC libere este neobișnuită pentru secrețiile de mucoase, apropiindu-se de concentrația ei din colostru (33).

Tabela 2

Componentele din lacrimă la persoane normale, raportate în literatură

Autori	Anul	Nr. subiecți	Proteine	IgG	IgA	SIgA	SC
Chodirker și Tomasi (28)	1963	7	—	0	7	—	—
Bracciolini (29)	1968						
— înainte de stimulare		40	—	urme	85	—	—
— după stimulare cu ceapă		40	—	urme	24	—	—
Barnett (30)	1968	6	—	3	31	—	—
Little și colab. (6)	1969	10	—	urme	21	—	—
Hazzi și colab. (31)	1970	9	—	79	23	—	—
Brauninger și Centifano (32)	1971	24	—	—	9—50	—	—
McClellan și colab. (8)	1973	74	810	14	17	—	—
Chandler și colab. (9)	1974	4	—	1	30	—	—
Pralea (11)	1979	—	—	—	32	—	4,3 (Ø mm)
Studiul prezent	1982	20	407	—	19	475	37,5

În condițiile reacției de difuzie în gel, inelul de precipitare poate fi dat fie de SC liberă, fie de SC legată în SIgA. Faptul că reacția de precipitare este dată de SC liberă, și nu de SC legată în SIgA, este demonstrat de electroforeza încrucișată, unde înălțimea clopotului de precipitare din dreptul startului este evident datorată SC libere, deoarece SIgA nu migrează practic de lîngă start (fig. 2).

Se observă triplarea liniei de precipitare, ceea ce ar putea prezenta fragmente de SC obținute prin proteoliza locală a SC libere (34).

Se mai observă o linie de precipitare pornită de la start, care întretaie liniile date de SC, le depășește și se întinde spre anod pînă la capătul plăcii.

Componenta care reacționează nu poate fi „proteina specifică a lacrimilor" (3), deoarece serul nostru imun este preparat cu SC liberă obținută din colostru, deci aceeași componentă se găsea ca impuritate în preparatul nostru de SC. Ea este o proteină puternic anodică, de tipul prealbuminei serice, cu care nu dă reacție de identitate (6). Aceeași componentă prezintă la difuzia radială un inel foarte mare de precipitare, cu atît mai mare cu cît inelul dat de SC liberă este mai mic (fig. 3).

Această interdependență este numai aparentă deoarece întretăierea liniilor de precipitare la electroforeză încrucișată (fig. 2) demonstrează totala lor diferență antigenică.

Imunoglobulina A secretoare, determinată prin reacția cu serul imun specific, indică o medie de 45,57 mg% (tabela 1), cantitate superioară celei indicate de reacția practicată cu serul imun pentru IgA monomer de 19,38 mg% (tabela 1) și superioară în majoritatea cazurilor celei exprimate de serul imun pentru SC liberă. Un exemplu al reacției de difuzie radială în gel cu serul anti-SIgA este dat în figura 4, în care se observă la același subiect asemănarea inelelor de precipitare cu cele de la reacția cu serul anti-SC liberă (fig. 3).

La electroforeza încrucișată, clopotul de precipitare este superior celui obținut cu serul imun anti-SC (fig. 5). Se observă și linia de precipitare de la start dată de SIgA, care nu a migrat în gelul cu antiser.

Aceste rezultate conduc la concluzia că serul anti-SIgA întrebuințat recunoaște mai puternic antigenul SC decît pe cel de IgA, cuprinzînd atît componenta SC liberă, cît și pe cea cuprinsă în moleculele de SIgA.

Imunoglobulina G. Majoritatea probelor testate cu serul anti-IgG nu au dat reacție de precipitare. Unele probe individuale dau totuși reacție de precipitare, care se poate datora extravazării sanguine prin trauma produsă la colectare. Nu este exclusă însă nici posibilitatea ca lacrimile acestor subiecți să conțină permanent IgG.

Media obținută prin cumularea datelor de la acești subiecți este de 20 mg% (tabela 1), cantitate apropiată de 14 mg%, menționată de McClellan și colab. (8).

Lactoferina. Prin reacția cu serul imun monospecific se obține o concentrație de 120 mg%, reprezentînd aproximativ 25% din proteinele totale (tabela 1).

La electroforeza încrucișată, lactoferina nu migrează de la start, dînd o reacție de fixare pe agaroză, însă migrează în gelul cu antiserul specific (fig. 6).

Albumina serică se găsește în lacrimi în concentrații mici (5,7 mg%). Electroforeza încrucișată este prezentată în figura 7.

Dacă se compară viteza de migrare a IgA de tip seric (fig. 1) cu cea a albuminei (fig. 7), se constată că ambele au aceeași viteză de migrare, confirmînd legătura covalentă dintre IgA și albumină (35).

Lizozimul este proteina care reprezintă 30—40% din cantitatea de proteine din lacrimi (3). Activitatea litică a lizozimului a fost de 5900 μg/ml, variind între limite extrem de mari (tabela 1). Această activitate litică mare exprimă de fapt concentrația mare a lizozimului din lacrimi (3).

Disc-electroforeza la pH acid, pentru separarea proteinelor bazice, cu precădere a lizozimului (ultima bandă din figura 8), precum și disc-electroforeza la pH alcalin, pentru separarea cu precădere a proteinei anodice (fig. 9), au evidențiat diferențe pregnante ale spectrului proteic de la individ la individ, indicînd prezența în cantitate mare la unele persoane a IgA sau a albuminei (fig. 8 și 9) sau a cantității foarte mari din proteina anodică (fig. 9).

Nu am sesizat diferențe la mobilitatea electroforetică a lizozimului (36) (fig. 8) și nici prezența mai multor izoenzime (37).

Din figura 8 reiese, concomitent cu heterogenitatea proteică dintre indivizi, existența clară a patru benzi proteice, prezente în mod constant la toți subiecții.

Separarea electroforetică a lacrimilor de la aceeași persoană, practicată la ambele pH-uri, este prezentată în figurile 10 și 11, demonstrînd complexitatea proteică a lacrimilor, cuprinzînd, prin ambele metode, toate proteinele prezente în lacrimi. De menționat prezența și a altor enzime în lacrimi, ca, de exemplu, glicozidazele (38).

Separarea în mediu acid, redată în figura 8, este întru totul asemănătoare separării unui amestec de lacrimi de la 10—12 persoane, prezentată de Bonavida și colab. (5), care nu identifică decît lizozimul.

Comparînd vitezele de migrare la pH acid ale proteinelor lacrimilor cu cele cunoscute ale componentelor din colostru, le putem identifica

Fig. 1. — Electroforeza încrucișată a proteinelor din lacrimi (probă individuală) cu serul anti-IgA inclus în gel.

Fig. 2. — Electroforeza încrucișată a proteinelor din lacrimi (probă individuală) cu serul anti-SC inclus în gel. Săgeata indică linia de precipitare în plus.

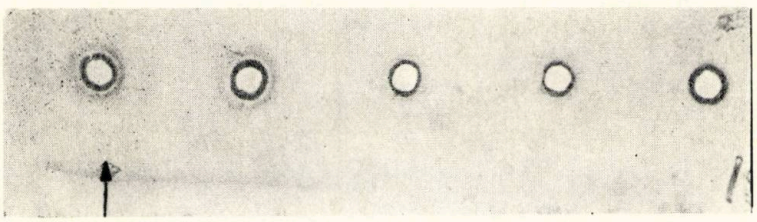


Fig. 3. — Difuzia radială cu serul imun anti-SC liberă inclus în gel. În godeuri, probe individuale. Săgeata indică marginea inelului de precipitare în plus.

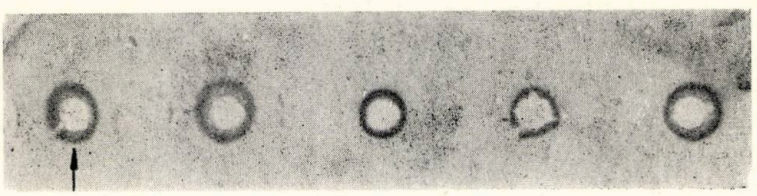


Fig. 4. — Difuzia radială cu serul imun anti-SIgA inclus în gel. În godeuri, lacrimi de la aceleași persoane ca în figura 3.

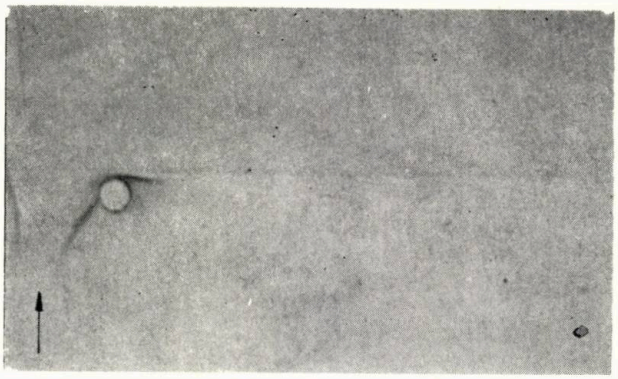


Fig. 5. — Electroforeza încrucișată a proteinelor din lacrimi (probă individuală) cu serul anti-SIgA inclus în gel.

Fig. 6. — Electroforeza încrucișată a proteinelor din lacrimi (probă individuală) cu serul antilactoferină inclus în gel.

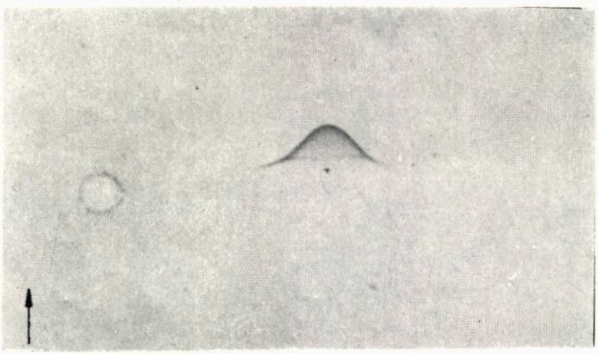


Fig. 7. — Electroforeza încrucișată a proteinelor din lacrimi (probă individuală) cu serul antialbumină inclus în gel.

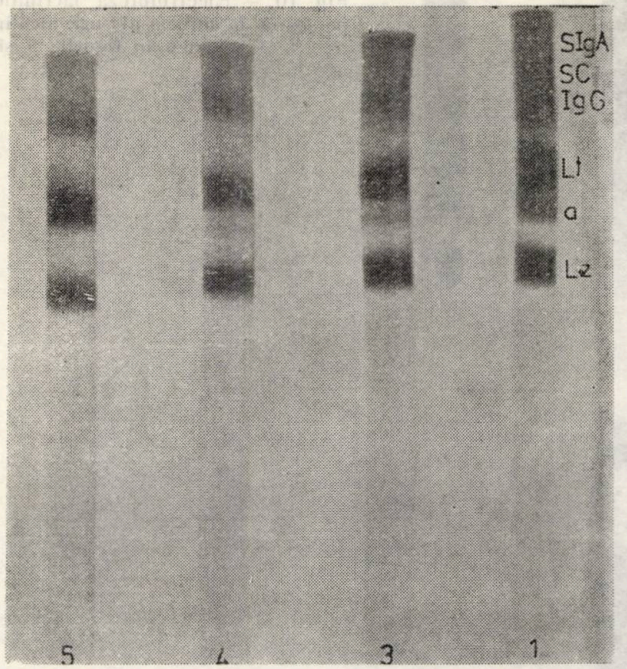


Fig. 8. — Disc-electroforeza la pH acid a probelor individuale de lacrimi de la primele trei persoane din figurile 3 și 4 (în ordinea 1, 5, 4 din tabela 1, disc-electroforeză).

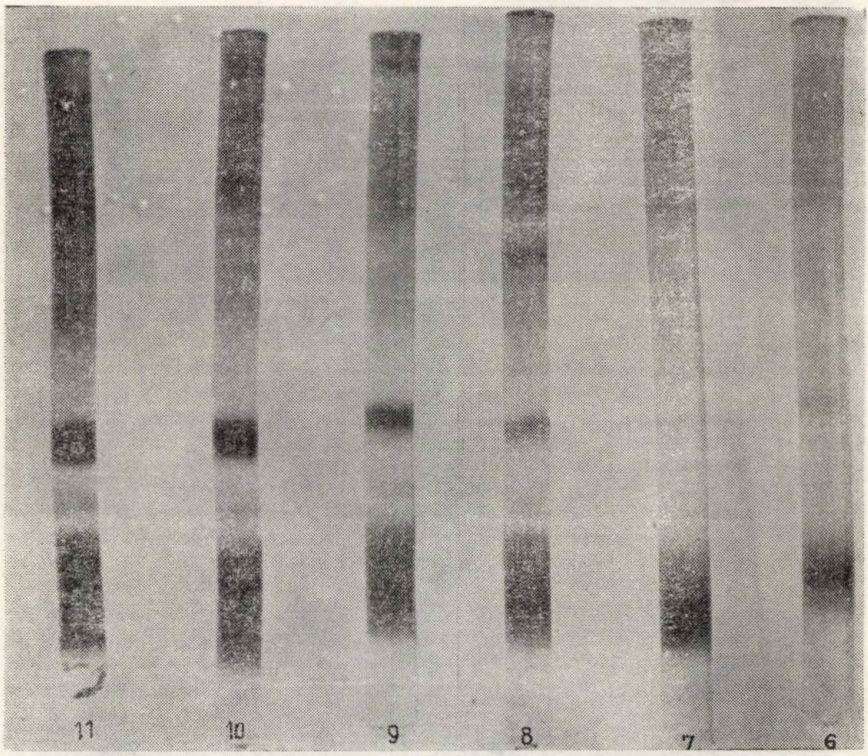


Fig. 9. — Disc-electroforeza la pH alcalin a probelor individuale de lacrimi de la primele trei persoane din figurile 3 și 4 (în ordinea 10, 7, 6 din tabela 1, disc-electroforeză).

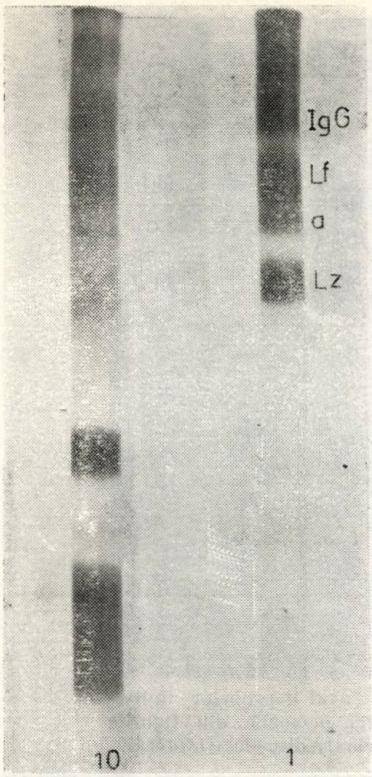


Fig. 10. — Electroforeza lacrimilor de la aceeași persoană la ambele pH-uri, alcalin și acid (primul godeu în figurile 3 și 4).

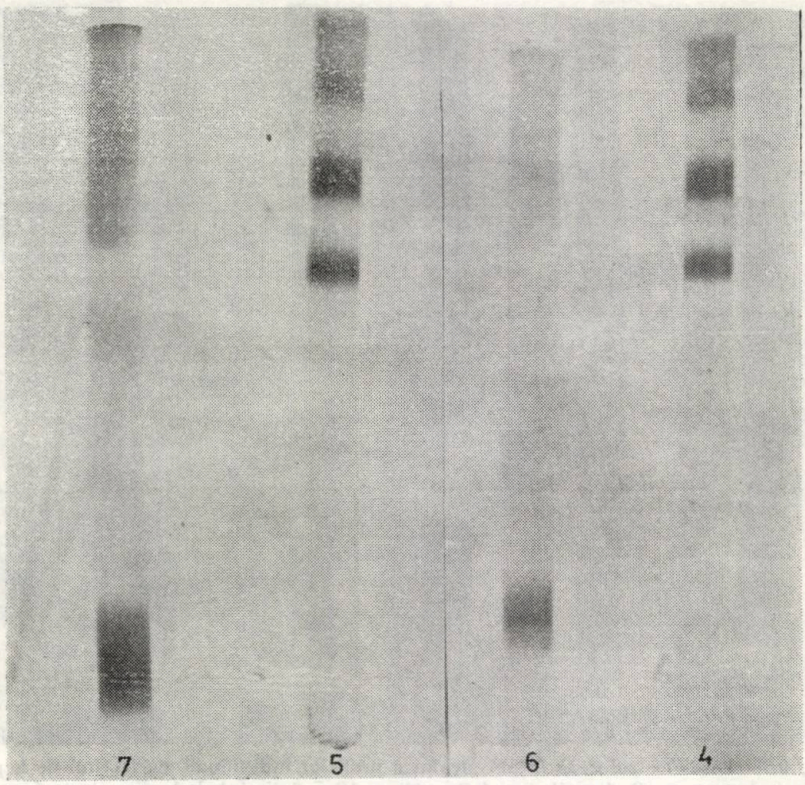


Fig. 11. — Electroforeza lacrimilor del a aceeași persoană la ambele pH-uri, alcalin și acid.

astfel : la start SIgA, urmată de SC liberă, lactoferină și lizozim, cu preponderența lactoferinei și a lizozimului.

Electroforeza la pH alcalin separă mult mai multe componente, din care predomină proteina anodică, reprezentînd, așa cum s-a menționat (3), 30% din proteinele lacrimilor.

În consecință, am stabilit valorile normale ale majorității componentelor din lacrimi cu serurile preparate de noi. Am demonstrat absența IgG din majoritatea probelor individuale și prezența, în cantități ce însumează 11% din proteinele totale, a IgA de tip monomer și a SC libere, pe lîngă SIgA. Am mai demonstrat că lactoferina reprezintă în jur de 25% din cantitatea totală de proteine din lacrimi. Activitatea litică extrem de mare a lizozimului indică o concentrație proteică echivalentă, care ar putea ajunge pînă la 30—40%, indicate de alți autori. În rest sînt cuprinse toate celelalte proteine din lacrimi, cu preponderență proteina anodică (fig. 9).

Rezultatele demonstrează, deci, prezența în lacrimi în cantități apreciabile a IgA monomer de tip seric, care nu poate proveni din serul sanguin deoarece ar fi trebuit ca concomitent să apară și IgG în cantitate superioară celei a IgA, păstrîndu-se proporția lor din sînge. Un fapt deosebit este prezența SC libere în lacrimi, al cărei rol este greu de definit.

Rezultatele mai demonstrează preponderența în lacrimi a proteinelor bazice, ca lizozimul și lactoferina, care formează împreună cu proteina acidă specifică sistemul tampon al lacrimilor (39).

Aceste proteine bazice pot constitui însă și principalul factor antiinfecțios al lacrimilor, cunoscute fiind proprietățile lor antiinfecțioase la nivelul granulocitelor sanguine.

Prezentat la redacție
la 1 decembrie 1983

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE MAIN COMPONENTS IN TEARS

SUMMARY

Secretory IgA (SIgA), secretory component (SC), IgA, IgG, lactoferrin, lysozyme (Lz) and albumin were quantitatively determined in tears. Radial immunodiffusion, cross-immunoelectrophoresis, alkaline and acid disc-electrophoresis in PAA were used. The results obtained by radial immunodiffusion showed that the concentrations of these components are : SIgA 45.57 mg%, SC 34.75 mg%, IgA 19.38 mg%, IgG 20 mg%, albumin 5.7 mg%, lactoferrin 120 mg%. Lytic activity of lysozyme is 5.9 mg/ml. Cross-immunoelectrophoresis indicated the presence of serum monomeric IgA and of the SC free besides that of SIgA. The correlation between the level of total proteins, the electrophoretic pattern both at alkaline and acid pH as well as the level of each component demonstrated that the basic proteins as lysozyme and lactoferrin are

dominating in tears. The involvement of these components in the activity of tears against the infections, besides the immunosecretory system, is discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. A. FLEMING, Proc. Roy. Soc., London, ser. B, **93,** 306 (1922).
2. A. S. JOSEPHSON, R. S. WEINER, J. Immunol., **160,** 1080 (1968).
3. A. T. SAPSE, B. BONAVIDA, W. STONE, E. E. SERCARZ, Arch. Ophthal., **81,** 815 (1969).
4. E. REGAN, Amer. J. Ophthal., **33,** 600 (1950).
5. B. BONAVIDA, A. T. SAPSE, E. E. SERCARZ, J. Lab. clin. Med., **70,** 951 (1967).
6. J. M. LITTLE, Y. M. CENTIFANO, H. E. KAUFMAN, Amer. J. Ophthal., **68,** 898 (1969).
7. J. D. MULL, J. H. PETERS, R. L. NICHOLS, Infect. Immunit., **2,** 489 (1970).
8. B. McCLELLAN, C. WHITNEY, L. NEWMAN, M. ALLANSMITH, Amer. J. Ophthal., **76,** 89 (1973).
9. J. W. CHANDLER, R. LEDER, H. E. KAUFMAN, J. R. CALDWELL, Invest. Ophthal., **13,** 151 (1974).
10. B. McCLELLAN, J. W. BETTMAN, M. ALLANSMITH, Amer. J. Ophthal., **78,** 106 (1974).
11. E. PRALEA, *Aspecte imunologice în keratoconjunctivite și uveite*, teză de doctorat, I.M.F. București, 1979.
12. M. ALLANSMITH, C. WHITNEY, B. McCLELLAN, L. NEWMAN, Arch. Ophthal., **89,** 36 (1973).
13. K. SHIMADA, A. M. SILVERSTEIN, Invest. Ophthal., **14,** 573 (1975).
14. R. G. DOUGLAS, R. D. ROSSEN, W. T. BUTLER, R. B. COUCH, J. Immunol., **99,** 297 (1967).
15. Y. CENTIFANO, H. E. KAUFMAN, *The development of tear antibodies and herpes simplex keratitis. The secretory immunologic system*, U. S. Dept. Health, Education and Welfare, 1971, p. 331.
16. J. E. OAKES, R. N. LAUSCH, Infect. Immunit., **33,** 109 (1981).
17. O. H. LOWRY, N. Y. ROSENBROUGH, A. FARR, R. J. RENDALL, J. biol. Chem., **193,** 265 (1951).
18. O. OUCHTERLONY, Acta path. microbiol., **26,** 507 (1949).
19. G. MANCINI, A. O. CARBONARA, J. F. HEREMANS, Immunochemistry, **2,** 235 (1965).
20. J. L. FAHEY, A. M. McKELVEY, J. Immunol., **94,** 84 (1965).
21. R. W. NEWCOMB, D. NORMANSELL, D. R. STANDWORTH, J. Immunol., **101,** 905 (1968).
22. J. MESTECKY, F. W. KRAUS, S. A. VOIGHT, Immunology, **18,** 237 (1970).
23. R. GOT, Clin. chim. Acta, **11,** 432 (1965).
24. E. F. OSSERMAN, D. P. LAWLOR, J. exp. Med., **124,** 921 (1966).
25. P. O. GANROT, Scand. J. Clin. Lab. Invest., **29,** Suppl. 124, 39 (1972).
26. R. A. REISFELD, V. J. LEWIS, D. E. WILLIAMS, Nature, **195,** 281 (1962).
27. B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121,** 404 (1964).
28. W. B. CHODIRKER, T. B. TOMASI, Science, **142,** 1080 (1963).
29. M. BRACCIOLINI, Ann. Otal. Clin. Ocul., **94,** 490 (1968).
30. E. BARNETT, J. Immunol., **100,** 1093 (1968).
31. C. HAZZI, R. CATTANCO, V. MICONE, M. FARINA, Prog. Immunobiol. Stand., **4,** 333 (1970).
32. G. E. BRAUNINGER, Y. M. CENTIFANO, Amer. J. Ophthal., **72,** 558 (1971).
33. L. A. HANSON, P. BRANDTZAEG, *Secretory antibody systems*, în *Immunologic disorders in infants and children*, sub red. E. R. STIEHM, V. A. FULGINITI, W. B. SAUNDERS, Philadelphia, 1971.
34. K. KOBAYASHI, J. P. VAERMAN, J. F. HEREMANS, Immunochemistry, **10,** 73 (1973).
35. M. MANNIK, J. Immunol., **99,** 899 (1967).
36. W. K. McEWEN, S. J. KIMURA, M. L. FEENCY, Amer. J. Ophthal., **45,** 67 (1958).
37. I. G. TAPASZTO, Z. VASS, L. KISS, Acta ophthal., **43,** 802 (1965).
38. A. TSUBOYAMA et al., Clin. chim. Acta, **80,** 237 (1977).
39. A. T. SAPSE, Amer. J. Ophthal., **66,** 76 (1968).

CARACTERIZAREA UNOR PREPARATE DE LECITINĂ DIN GĂLBENUȘ DE OU

VICTORIA DOBRE, VL. GHEORDUNESCU

Rezumat. Fosfatidilcolina (lecitina) din gălbenușul de ou a fost parțial purificată prin precipitare cu acetonă și prin extracție în alcool etilic.
Conținutul în fosfor și greutatea moleculară ale preparatului de lecitină (păstrat în cloroform la 4°C) sînt apropiate de cele ale produselor din ou Merck și Sigma (păstrate la 4°C).
Cromatografia în strat subțire arată că lecitina preparată de noi conține încă o componentă importantă și urme de lipide neutre. Prin compoziția sa, proba este comparabilă cu produsul Sigma.
Metoda de separare menționată este simplă și furnizează șarje reproductibile de lecitină, care a fost utilizată la prepararea lipozomilor.

Cercetări recente asupra membranelor artificiale lipidice au evidențiat utilizarea lor potențială ca vehicule purtătoare de substanțe biologic active, denumite lipozomi (1), (2), (3).

Componentele lipidice folosite la obținerea lipozomilor sînt fosfolipidele, în principal fosfatidilcolina, în amestec cu colesterolul și cu alte lipide încărcate electric, de tipul acizilor fosfatidici sau stearilaminei.

În lucrarea de față s-au urmărit purificarea parțială a lecitinei din gălbenușul de ou și caracterizarea analitică a produsului obținut, comparativ cu alte preparate comerciale de lecitină din import. Caracterizarea analitică a lecitinei obținute a cuprins determinarea concentrației specifice în fosfor, estimarea greutății moleculare, precum și identificarea altor lipide polare și nepolare.

MATERIAL ȘI METODE

Solvenții p.a., obținuți de la „Reactivul'' București, au fost utilizați fără altă purificare.

Ouăle necesare preparării lecitinei au fost procurate din comerț.

Preparate comerciale de lecitină: două preparate de lecitină pastă, din gălbenuș de ou, au fost procurate de la firmele Merck și Sigma și au fost păstrate la 4°C; L-α-dipalmitil-fosfatidilcolina sintetică a fost obținută de la firma Serva.

Standarde cromatografice: lecitină extrapură, pastă, din gălbenuș de ou, păstrată sub azot, obținută prin bunăvoința dr. De Gier (Olanda); colesterol p.a., Fluka; trioleină (componentul major al uleiului de măsline).

Lecitina din gălbenușul de ou a fost parțial purificată conform primelor etape ale metodei Pangborn (4), care constau în precipitare cu acetonă și în extracție în alcool etilic. Pro-

ba de lecitină, obținută la 37°C prin evaporarea alcoolului etilic la evaporatorul rotativ, a fost uscată în exsicator și reluată în cloroform (30—50 mg pastă/ml cloroform). Alicote din această soluție, păstrată la 4°C, au fost analizate astfel :

Fosforul a fost determinat cu reactiv Briggs în hidrolizatul acid al soluției cloroformice de lecitină, adaptînd metoda pentru lecitina din ser (5) : 0,1—0,5 ml soluție cloroformică de lecitină sînt supuși hidrolizei la cald, cu H_2SO_4 conc., în prezența unor cantități minimale de perhidrol, pînă la decolorare totală, persistentă la încălzirea în continuare. Hidrolizatul acid obținut s-a trecut cantitativ în balon cotat de 100 ml. Alicote de 0,5—1 ml din această soluție au fost supuse determinării P. Pentru curba standard de P s-a folosit KH_2PO_4 uscat la 105°C pînă la greutate constantă (concentrația maximă pentru construirea curbei standard : 1,0 μmol P/ml).

Separarea lecitinei și a componentelor minore din preparatele de lecitină a fost realizată prin cromatografie în strat subțire (6), (7) în sistem ascendent, pe plăci comerciale Merck tip HPTLC-Alufolien, Kieselgel 60 F 254. Drept solvenți de migrare au fost utilizați metanolul pentru lipidele polare și sistemul eter : benzen : etanol : acid acetic (100 : 125 : 5 : 0,5) pentru cele nepolare — solvent Freeman și West (6). Detecția spoturilor s-a făcut cu vapori de iod.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Tabela 1 prezintă conținutul în P, precum și greutățile molecular-(G_M) ale lecitinei din preparatele considerate, calculate pe baza concentrațiilor specifice în P. Se observă reproductibilitatea probelor noastre la preparare și la păstrare în timp : probele de lecitină obținute în 1982, păstrate în soluție cloroformică la 4°C și analizate în 1983, au arătat valori apropiate cu cele obținute și analizate în 1983.

Considerînd concentrațiile specifice în P și valorile G_M, reiese de asemenea că probele noastre se aseamănă cu preparatele comerciale — din gălbenuș de ou — Merck și Sigma.

Tabela 1

Conținutul în fosfor și greutățile moleculare (G_M) ale diferitelor lecitine

Lecitina	mg/ml	μmol P/ml	$\frac{\mu mol\ P}{mg\ pastă}$	G_M lecitină
Merck	31,5	37,4	1,18	847
Sigma	15,9	22,0	1,38	722
Serva (sintetică)	10,0	15,0	1,50	666
extrapură	9,5	9,5	1,00	1000
1982 martie	31,7	38,7	1,21	819
iulie	31,7	45,1	1,42	702
1983 aprilie	50,0	58,0	1,16	858
iunie	50,0	60,0	1,20	833

Ținînd seama de numărul de gălbenușuri luate în lucru la fiecare experiment și pe baza datelor obținute, am calculat randamentele de preparare a lecitinei parțial purificate, ale căror valori se înscriu între 60 și 80 g lecitină pastă/100 gălbenușuri (tabela 2).

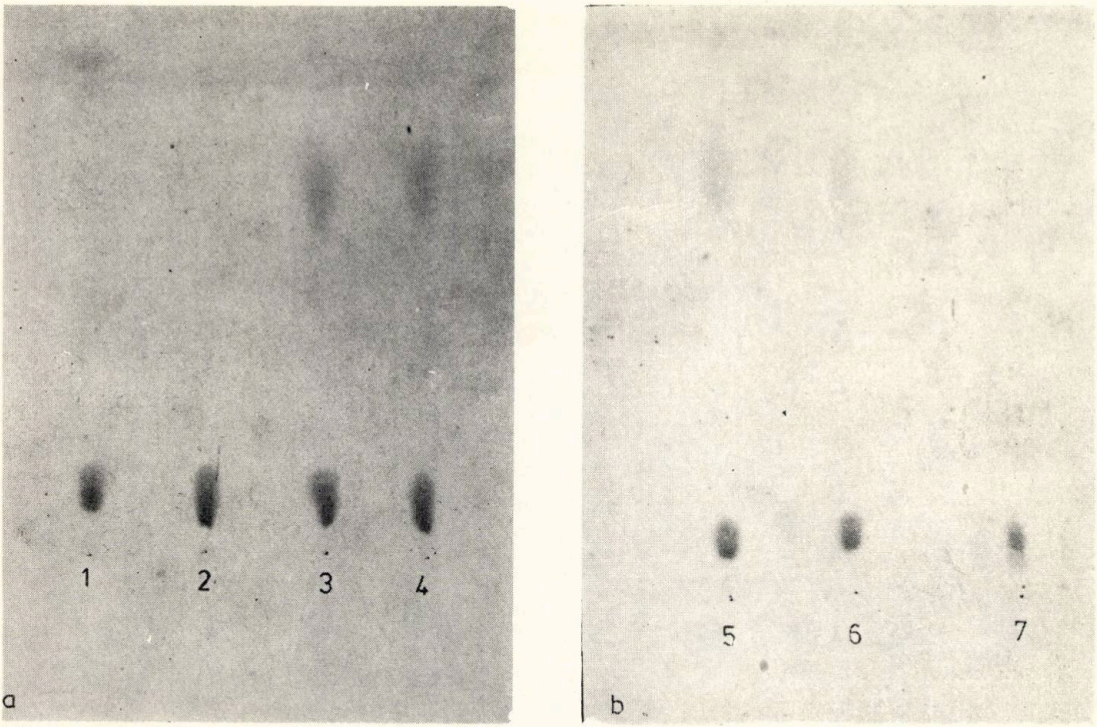


Fig. 1. — Analiza cromatografică în strat subțire a lipidelor polare prezente în diferite preparate de lecitină din gălbenușul de ou. Au fost aplicați 5 µl/spot dintr-o soluție de lecitină cu 3,17 µmol P/ml cloroform. Solventul de migrare utilizat :

a) metanol : 1, Merck ; 2, extrapură ; 3, 1983 aprilie ; 4, 1982 martie ;

b) cloroform : metanol (1 : 4) : 5, 1982 martie ; 6, 1983 iunie ; 7, Merck.

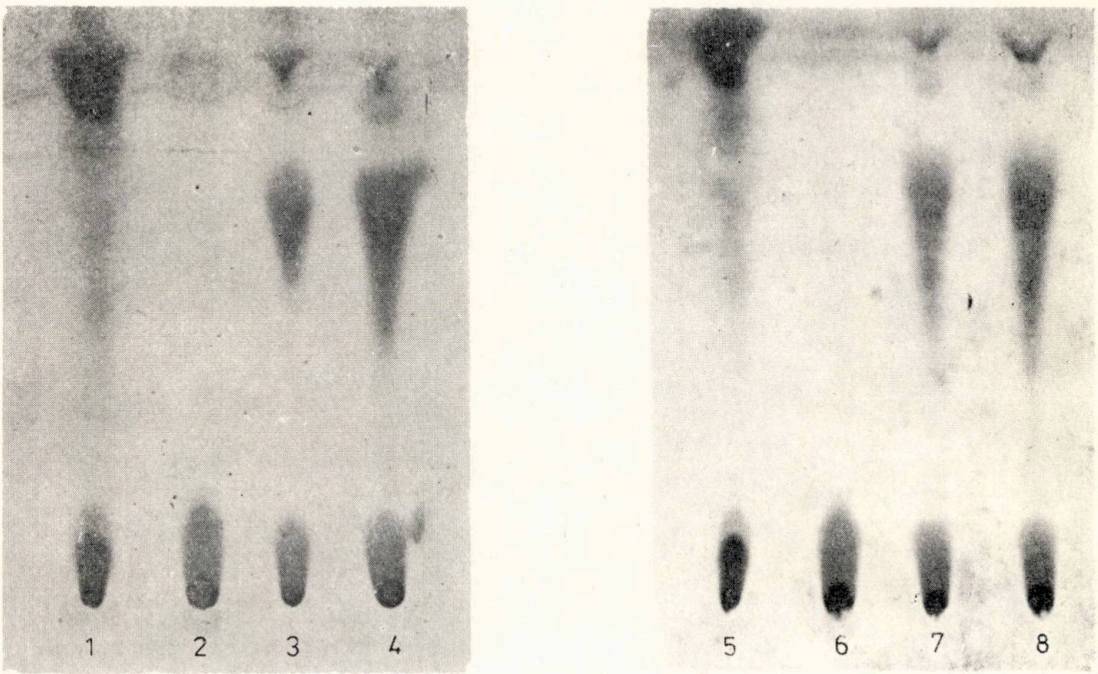
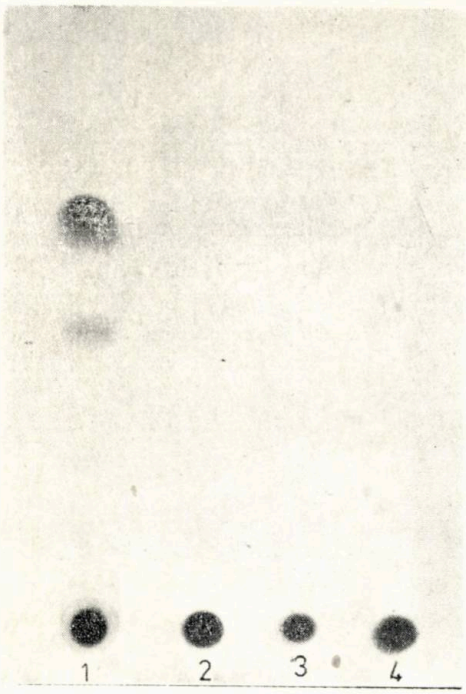


Fig. 2. — Analiza cromatografică în strat subțire a lipidelor polare prezente în diferite preparate de lecitină din gălbenușul de ou. Au fost aplicați 5 µl/spot dintr-o soluție de lecitină cu 31,7 µmol P/ml cloroform. Solventul de migrare utilizat : metanol. 1, Merck ; 2, extrapură ; 3, Sigma ; 4, 1982 martie ; 5, Merck ; 6, extrapură ; 7, 1982 iulie ; 8, 1983 aprilie.



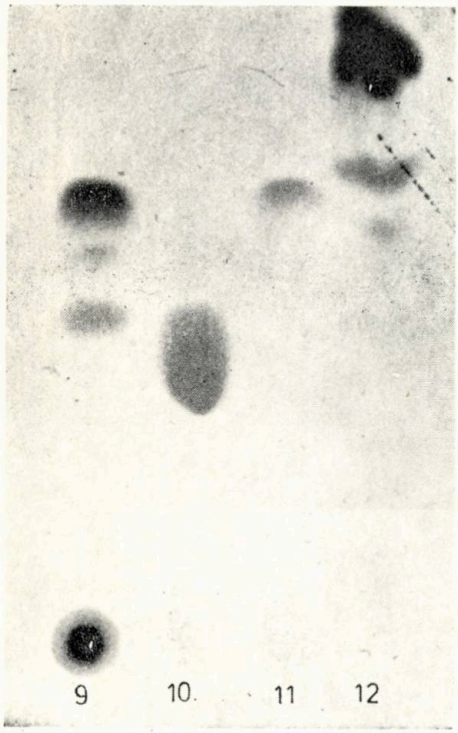


Fig. 3. — Analiza cromatografică în strat subțire a lipidelor nepolare prezente în diferite preparate de lecitină din gălbenușul de ou. Au fost aplicați 5 µl/spot dintr-o soluție de lecitină cu 31,7 µmol P/ml cloroform. Solventul de migrare utilizat : eter : benzen : etanol : acid acetic (100 : 125 : 5 : 0,5). 1 și 9, Merck ; 2, extrapură ; 3, Sigma ; 4 și 8, Serva (sintetică) ; 5, 1982 martie ; 6, 1982 iulie ; 7, 1983 aprilie ; 10, colesterol p.a., Fluka ; 11, acid stearic p.a. ; 12, trioleină (ulei de măsline).

Tabela 2

Randamentul de obținere a lecitinei parțial purificate din gălbenușul de ou

Lecitina	Nr. gălbenușuri	Pastă (g)	Randament (g pastă/100 gălbenușuri)
1982 martie	18	13,077	72,0
iulie	36	22,890	63,5
1983 aprilie	48	38,141	79,5
iunie	50	39,700	79,5

Metoda de separare și purificare folosită de noi (4) este simplă; precipitarea lecitinei se face din gălbenuș integral, și nu din lipidele totale, separate în prealabil, cum prevăd alte metode (8).

Analiza cromatografică în strat subțire a fost efectuată separat pentru lipidele polare și nepolare. În faza mobilă polară, reprezentată de metanol (fig. 1 a), lecitina preparată de noi este impurificată cu o componentă polară majoră, neidentificată din lipsa standardelor. Adaosul de cloroform la faza mobilă polară, metanolică, în proporția 1 : 4, nu schimbă semnificativ aspectul cromatografic al probelor (fig. 1 b). Lecitina noastră este asemănătoare lecitinei Sigma (fig. 2) și diferită de lecitina Merck, care este impurificată cu mai multe componente polare (fig. 1 și 2).

Analiza lipidelor polare, menționată mai sus, atestă încă o dată reproductibilitatea probelor noastre.

Figura 3 evidențiază lipidele nepolare conținute în probele analizate. Prin utilizarea solventului de migrare — nepolar —, compus din eter : benzen : etanol : acid acetic (100 : 125 : 5 : 0,5), lecitina se regăsește pe strat, după cum era de așteptat. Ca și preparatele Sigma și Serva, probele noastre conțin numai urme de lipide nepolare. Lecitina Merck este impurificată cu mai multe componente nepolare, cea majoră prezentînd un Rf asemănător acidului stearic. Figura 3 confirmă puritatea probei de lecitină extrapură și evidențiază, de asemenea, reproductibilitatea probelor noastre la preparare și la păstrare în cloroform la 4°C.

Datele experimentale prezentate susțin utilizarea lecitinei parțial purificate în laborator (4) la prepararea lipozomilor (9), (10), (11) în locul preparatelor comerciale.

CONCLUZII

1. Conținutul în fosfor și greutatea moleculară calculată ale lecitinei parțial purificate în laborator din gălbenuș de ou sînt apropiate valorilor ce aparțin preparatelor comerciale Merck și Sigma.

2. Lecitina preparată este impurificată cu o componentă polară și

prezintă urme de lipide nepolare, prin aceste caracteristici asemănîndu-se preparatului Sigma. Lecitina Merck conține mai multe componente polare, iar lipidele nepolare sînt în cantitate crescută.

3. Obținerea lecitinei parțial purificate din gălbenuș de ou prin fracționări cu solvenți este reproductibilă, avantajoasă economic și comodă; la prepararea lipozomilor, lecitina obținută poate înlocui preparatele comerciale.

Prezentat la redacție
la 1 decembrie 1983

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

THE CHARACTERIZATION OF SOME EGG YOLK LECITHIN PREPARATIONS

SUMMARY

The phosphatidylcholine (lecithin) from the egg yolk was partially purified by acetone precipitation and ethyl alcohol extraction.

The phosphorus content (P) and the molecular weight (G_M) of lecithin preparation (kept in chloroform at 4°C) are close to those of the commercial Merck and Sigma egg yolk products (kept at 4°C).

The thin layer chromatography has shown that the prepared lecithin contains also a major polar component and neutral lipids as traces. By its composition the sample is comparable with the Sigma product.

The above method is simple and yields reproducible batches of lecithin which have been used for the preparation of liposomes.

BIBLIOGRAFIE

1. G. GREGORIADIS, A. C. ALLISON (sub red.), *Liposomes in biological systems*, John Wiley and Sons Ltd., New York, 1980.
2. *Research monographs in cell and tissue physiology*, vol. 7: *Liposomes: From physical structure to therapeutic applications*, C. G. KNIGHT (sub red.), Elsevier/North-Holland and Biomedical Press, Amsterdam, 1981.
3. VICTORIA DOBRE, St. cerc. biochim., **25**, 96 (1982).
4. M. C. PANGBORN, J. biol. Chem., **188**, 471 (1955).
5. G. TĂNĂSESCU, G. COSTESCU, *Lucrări practice de biochimie medicală*, Edit. didactică și pedagogică, București, 1966, p. 192.
6. M. KATES, *Technique of lipidology*, 2nd ed., North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1975.
7. K. RANDERATH, *Chromatographie sur couches minces*, Gautier-Villars, Paris, 1964.
8. D. PAPADJOPOULOS, M. MILLER, Biochim. biophys. Acta, **135**, 4 (1967).
9. VICTORIA DOBRE, C. DIMITRIU, FLORICA CHELU, St. cerc. biochim., **23**, 21 (1980).
10. VICTORIA DOBRE, CECILIA MOTAȘ, Rev. roum. Biochim., **17**, 247 (1982).
11. VICTORIA DOBRE, D. GEORGESCU, LIGIA SIMIONESCU, ECATERINA AMAN, V. STROESCU, CECILIA MOTAȘ, Rev. roum. Biochim., **20**, 15 (1983).

IZOLAREA UNEI PROTEINE DIN TEACA DE MAZĂRE *(PISUM SATIVUM)* CU EFECT REGLATOR ASUPRA PEROXIDAZEI DIN HREAN

MARGARETA DUMITRESCU, H. D. SCHELL*, LUCIA BUZILĂ*, TR. BENȚIA*

Rezumat. Prin cromatografie de afinitate pe un suport bioselectiv format din peroxidază imobilizată pe agaroză activă cu BrCN s-a putut izola din teaca semințelor de mazăre (*Pisum sativum*) un efector proteic al acestei enzime. Efectorul izolat are o componentă antigenică comună cu extractul total și manifestă pînă la o anumită concentrație o acțiune inhibitoare asupra activității catalitice a peroxidazei, după care efectul se inversează. Rezultatele experimentale obținute arată că acțiunea biochimică a efectorului izolat este dependentă de conținutul său în grupări tiolice.

Într-o lucrare anterioară (1), am semnalat prezența unor efectori ai peroxidazei în teaca semințelor leguminoasei *Anthyllis vulneraria*, care au fost izolați apoi prin cromatografie de afinitate și caracterizați din punct de vedere cinetic (2).

Pornind de la presupunerea că astfel de efectori ai peroxidazei ar putea fi prezenți și în teaca altor leguminoase, am studiat în continuare și un extract obținut din teaca de mazăre (*Pisum sativum*). Întrucît experiențele preliminare ne-au confirmat această presupunere, ne-am propus în lucrarea de față separarea prin cromatografie de afinitate a efectorilor prezenți în extractul total de mazăre și caracterizarea lor.

MATERIAL ȘI METODE

Obținerea extractului. Extractul total a fost obținut prin omogenizarea unui gram de teacă de mazăre uscată și fin mărunțită în 30 ml soluție tampon de acid acetic-acetat 0,02 M, pH 4,8, care conținea și metabisulfit de potasiu 0,02 M, ca inhibitor al fenoloxidazelor. După un timp de extracție de o săptămînă la rece, supernatantul era separat printr-o centrifugare de 15 min la 3 000 rpm.

Izolarea efectorului prin cromatografie de afinitate. Drept suport bioselectiv pentru separarea prin cromatografie de afinitate a efectorului din teaca de mazăre s-a folosit un suport realizat prin cuplarea covalentă a peroxidazei din hrean de agaroză activată cu BrCN (3). În acest scop s-a pregătit o coloană cromatografică de 0,8 × 7 cm, încărcată cu suportul bioselectiv, peste care s-au trecut apoi 5 ml de extract brut din teaca de mazăre, recoltînd fracțiuni a cîte 3 ml. Pentru urmărirea mersului cromatografierii, s-a folosit un înregistrator automat LKB (Suedia). Eluția efectorului reținut de coloană s-a realizat cu un eluent format din HCl 0,1 N cu KCl 2 M.

Concentrația proteică a fost determinată în fracțiunile culese atît spectrofotometric prin determinarea absorbției la 280 nm, cît și prin metoda clasică Lowry.

Determinarea acțiunii efectorului izolat asupra activității peroxidazei a fost urmărită printr-o metodă cronometrică (4) și una cinetică (5).

Determinarea compoziţiei proteice a extractului brut din teaca de mazăre şi din fracţiunea izolată prin cromatografie de afinitate s-a efectuat prin metoda disc-electroforetică în sistem vertical în gel de poliacrilamidă după metoda Davis (6). După electroforeză, gelurile au fost colorate prin metode curente, fie cu Amidoschwarz pentru proteine, fie cu fucsină pentru glicoproteine.

Prepararea serurilor imune s-a făcut pe iepuri. Administrarea extractului total a avut loc în trei reprize a cîte 10 injecţii intradermice pe abdomenul animalului. La primele două reprize s-au injectat fiecărui animal cîte 2 mg antigen în 1 ml ser fiziologic cu 1 ml adjuvant Freund complet (Calbiochem). La ultima repriză s-a injectat 1 mg antigen dizolvat în 0,5 ml ser fiziologic cu 0,5 ml adjuvant Freund. Intervalul dintre reprize a fost de două săptămîni. La 10 zile după ultima injecţie, animalele s-au sîngerat din vena urechii pentru proba de verificare a prezenţei anticorpilor. Anticorpii s-au evidenţiat prin metoda dublei difuzii Ouchterlony (7).

Determinarea conţinutului în grupări -SH din efectorul separat. Întrucît în cazul efectorilor izolaţi din teaca leguminoasei *Anthyllis vulneraria* s-au putut dovedi prezenţa de grupări -SH şi variaţia acestora în funcţie de condiţiile de extracţie şi de păstrare în timp, aceste grupări au fost determinate şi în cazul efectorului izolat din teaca de mazăre, prin aceeaşi metodă (8).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Suportul bioselectiv realizat prin legarea covalentă a peroxidazei din hrean de agaroză perlată şi activată cu BrCN este catalitic activ şi are un conţinut de 2,4 mg proteină/ml gel depus. Suportul afin realizat prezintă proprietăţi mecanice foarte bune şi a putut fi folosit în bune condiţii la separarea efectorului din extractul total de teacă de mazăre. Efectorul reţinut de partenerul său afin se eluează în două, cel mult trei, eprubete, cu eluentul format dintr-o soluţie de KCl 2 M în HCl 0,1 N. Fracţiunile reunite posedă o concentraţie proteică de 0,3 mg/ml.

În figura 1 este reprezentată diagrama de eluţie.

Din datele obţinute la analiza electroforetică în gel de poliacrilamidă se constată, în cazul proteinogramei extractului total, prezenţa a două fracţiuni, dintre care una mai puternică, cu viteza medie de migrare anodică, şi una mai slabă, cu viteză mare de migrare anodică (fig. 2, a1).

Spre deosebire de extractul total, fracţiunea separată prin cromatografie de afinitate prezintă o singură bandă proteică, şi anume cea cu viteza de migrare mai mică. Înseamnă că suportul bioselectiv a recunoscut numai această fracţiune proteică, pe care a legat-o prin afinitate şi care s-a desorbit de pe suport doar prin metode mai drastice de eluţie (fig. 2, a2).

Rezultatele obţinute la detectarea glicoproteinelor de pe electroforegramele respective (fig. 2, b) vin să confirme datele constatate în cazul proteinelor. Din glicoproteinograma extractului total rezultă totodată că cea de-a doua fracţiune, corespunzătoare proteinelor cu viteză mare de migrare anodică, este deosebit de pronunţată, dovedind caracterul puternic glicoproteic al acestei fracţiuni, care nu este reţinută de suportul bioselectiv.

Analiza imunochimică, reprezentată în figura 3, a evidenţiat natura antigenică a extractului total. Se observă apariţia a două linii de precipitare, una mai slabă şi alta mult mai pronunţată, ceea ce denotă prezenţa a două componente antigenice în extractul total. Cu antiserul obţinut de

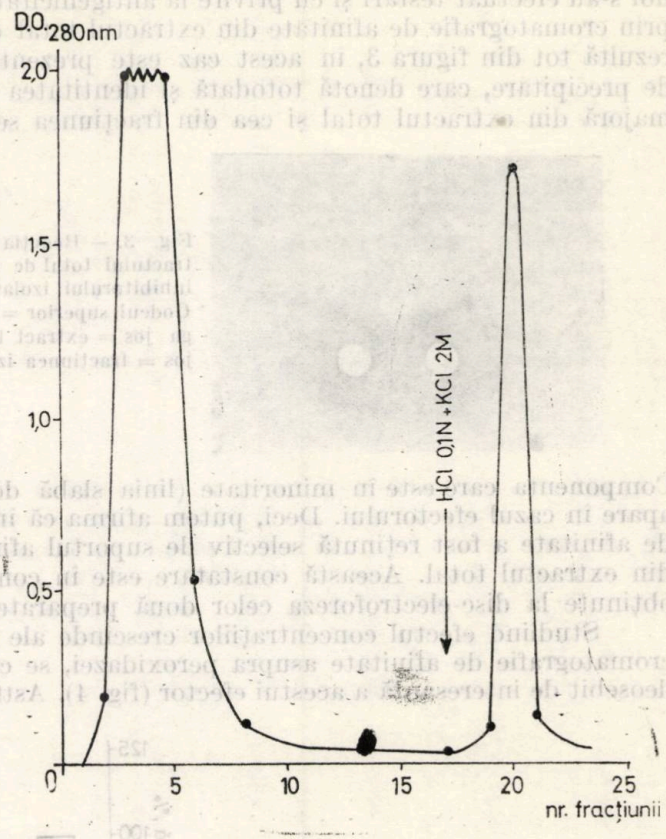


Fig. 1. — Separarea prin cromatografie de afinitate a unei proteine din teaca de mazăre cu efect reglator asupra activității peroxidazei, folosind ca suport bioselectiv peroxidaza din hrean imobilizată prin legare covalentă de agaroză perlată și activată cu BrCN.

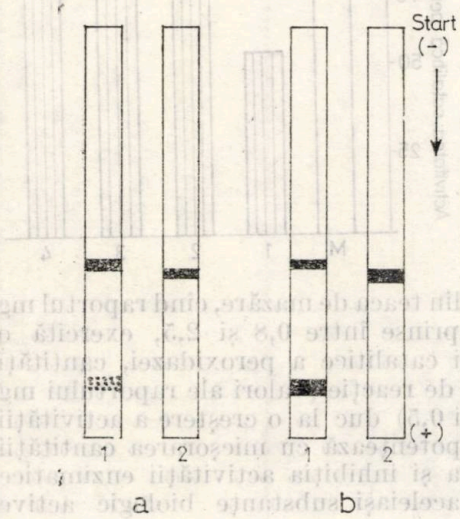


Fig. 2. — Electroforegramele proteinelor (a) și glicoproteinelor (b) conținute în extractul total de mazăre (1) și în fracțiunea izolată prin cromatografie de afinitate (2) pe un suport afin format din peroxidază imobilizată.

noi s-au efectuat testări şi cu privire la antigenicitatea fracţiunii separate prin cromatografie de afinitate din extractul total de mazăre. După cum rezultă tot din figura 3, în acest caz este prezentă doar o singură linie de precipitare, care denotă totodată şi identitatea care există între linia majoră din extractul total şi cea din fracţiunea separată cromatografic.

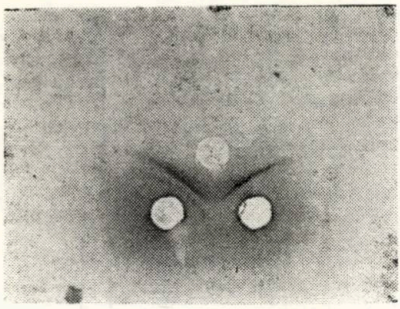


Fig. 3. — Reacţia Ouchterlony a extractului total de teacă de mazăre şi a inhibitorului izolat, faţă de serul imun. Godeul superior = antiser; godeul stinga jos = extract total; godeul dreapta jos = fracţiunea izolată cromatografic.

Componenta care este în minoritate (linia slabă de precipitare) nu mai apare în cazul efectorului. Deci, putem afirma că în urma cromatografiei de afinitate a fost reţinută selectiv de suportul afin componenta majoră din extractul total. Această constatare este în concordanţă şi cu datele obţinute la disc-electroforeza celor două preparate.

Studiind efectul concentraţiilor crescînde ale fracţiunii izolate prin cromatografie de afinitate asupra peroxidazei, se constată o comportare deosebit de interesantă a acestui efector (fig. 4). Astfel, în timp ce concen-

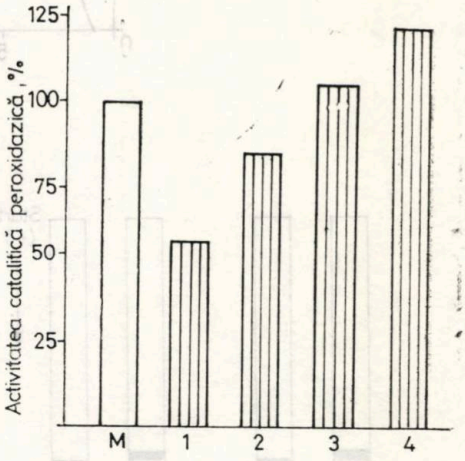


Fig. 4. — Acţiunea efectorului izolat din teaca de mazăre asupra activităţii catalitice a peroxidazei în funcţie de concentraţia sa. Valoarea raportului mg efector/mg enzimă = 2,5 (1), 0,8(2), 0,5(3), 0,1(4); M = martor.

traţiile mai mari ale efectorului izolat din teaca de mazăre, cînd raportul mg efector/mg enzimă prezintă valori cuprinse între 0,8 şi 2,5, exercită o acţiune de inhibare asupra activităţii catalitice a peroxidazei, cantităţi mai mici ale acestui efector în mediul de reacţie (valori ale raportului mg efector/mg enzimă cuprinse între 0,1 şi 0,5) duc la o creştere a activităţii peroxidazice a enzimei, efect care se potenţează cu micşorarea cantităţii de efector folosit în reacţie. Activarea şi inhibiţia activităţii enzimatice prin concentraţii diferite ale uneia şi aceleiaşi substanţe biologic active

reprezintă un fenomen foarte rar întîlnit, semnalat pînă acum numai în cazul acțiunii unor anioni „haotropi", printre care SCN^-(9), și nu și în cazul efectorilor macromoleculari enzimatici cunoscuți.

Pentru a vedea dacă există o corelație între acest efect și numărul de grupări tiolice existente în efector, am urmărit, pe de o parte, variația acestora din molecula efectorului în funcție de timp și în funcție de prezența și absența unui protector al lor (metabisulfit de potasiu) și am putut observa existența unui număr mai crescut al grupărilor tiolice în cazul prezenței reactivului protector (fig. 5). Se constată însă chiar în prezența metabisulfitului în mediu o micșorare a numărului grupărilor

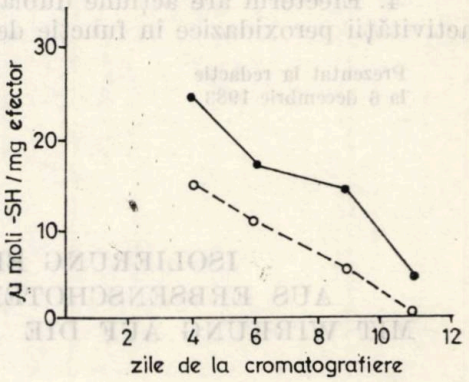


Fig. 5. — Scăderea conținutului în grupări -SH din efectorul izolat din teaca de mazăre, în funcție de timpul de păstrare, în prezența (●——●) și în absența (o----o) metabisulfitului de potasiu.

tiolice în timp, care este totuși mai puțin pronunțată în comparație cu efectorul lipsit de protector. Pe de altă parte, am urmărit acțiunea efectorului protejat și neprotejat asupra activității catalitice a peroxidazei (fig. 6) și am constatat întotdeauna o acțiune inhibitoare mai puternică

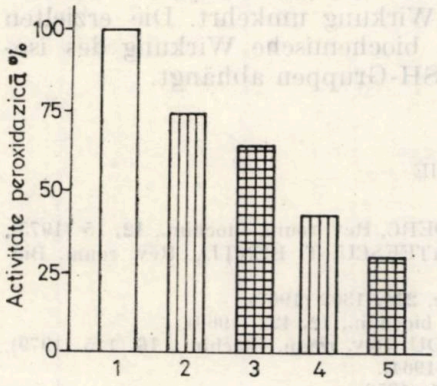


Fig. 6. — Acțiunea efectorului izolat din teaca de mazăre asupra activității catalitice a peroxidazei în funcție de conținutul său în grupări tiolice, în prezența și în absența metabisulfitului de potasiu.
1, Martor (activitatea peroxidazei în absența efectorului); 2, activitatea peroxidazei în prezența a 0,03 mg efector (neprotejat cu metabisulfit): 0,45 µmoli -SH; 3, activitatea peroxidazei în prezența a 0,03 mg efector (protejat cu metabisulfit): 0,75 µmoli -SH; 4, activitatea peroxidazei în prezența a 0,06 mg efector (neprotejat cu metabisulfit): 0,90 µmoli -SH; 5, activitatea peroxidazei în prezența a 0,06 mg efector (protejat cu metabisulfit): 1,50 µmoli -SH.

a efectorului protejat și proaspăt. Acest fapt denotă, fără îndoială, rolul important al grupărilor tiolice în acțiunea biochimică a efectorului izolat prin cromatografie de afinitate.

CONCLUZII

1. Din extractul total de mazăre s-a putut izola într-o singură fază de lucru un efector al peroxidazei prin cromatografie de afinitate pe un suport bioselectiv obţinut prin legarea covalentă a peroxidazei de agaroză activată cu BrCN.

2. Efectorul izolat are o componentă antigenică comună cu extractul total, observaţie confirmată şi de electroforegrama proteinelor şi glicoproteinelor.

3. Acţiunea biochimică a efectorului izolat este dependentă de conţinutul său în grupări tiolice.

4. Efectorul are acţiune dublă, activatoare sau inhibitoare, asupra activităţii peroxidazice în funcţie de condiţiile experimentale.

Prezentat la redacţie
la 6 decembrie 1983

Institutul „Dr. V. Babeş"
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 99
şi
* *Institutul de ştiinţe biologice*
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

ISOLIERUNG EINES PROTEINS AUS ERBSENSCHOTEN *(PISUM SATIVUM)* MIT WIRKUNG AUF DIE MEERRETTIG-PEROXIDASE

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Affinitätschromatographie an trägerfixierter Peroxidase konnte aus den Schoten der Erbse *(Pisum sativum)* ein proteinhaltiger Effektor dieses Enzyms isoliert werden. Der isolierte Effektor besitzt eine mit dem Rohextrakt gemeinsame antigenische Komponente und wirkt bis zu einer gewissen Konzentration hemmend auf die katalytische Aktivität der Peroxidase, wonach sich seine Wirkung umkehrt. Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, daß die biochemische Wirkung des isolierten Effektors von seinem Gehalt an SH-Gruppen abhängt.

BIBLIOGRAFIE

1. M. DUMITRESCU, R. GORENFLOT, H. COUDERC, Rev. roum. Biochim., **12**, 15 (1975).
2. M. DUMITRESCU, H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, T. BENŢIA, Rev. roum. Biochim., **19**, 2 (1982).
3. R. AXÉN, J. PORATH, S. ERNBACK, Nature, **214**, 1302 (1967).
4. I. BRAD, G. OLTEANU, Z. MARCU, St. cerc. biochim., **12**, 423 (1969).
5. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, E. C. BUDU, Rev. roum. Biochim., **16**, 115 (1979).
6. B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
7. O. OUCHTERLONY, Acta path. scand., **32**, 231 (1953).
8. J. SEDLAK, R. LINDSAY, Ann. Biochem., **25**, 192 (1968).
9. W. WEUFFEN, *Medizinische und biologische Bedeutung der Thiocyanate (Rhodanide)*, VEB, Volk und Gesundheit, Berlin, **1982**, p. 63.

DISTRIBUȚIA UNOR ENZIME LA NIVELUL DIFERITELOR SEGMENTE ALE TRACTULUI DIGESTIV DE COBAI

I. F. DUMITRU, DANA IORDĂCHESCU, DIANA DINU, B. SOW

Rezumat. S-a studiat localizarea la nivelul tractului digestiv de cobai tineri (de 14 zile) a unor enzime implicate în sistemele de transport activ, în glicoliză și digestie. Astfel, a fost studiată repartiția unor enzime legate de metabolismul fosforului (RN-aza acidă, fosfataza acidă și alcalină și ATP-aza), al acizilor grași (arilesteraza), al glucidelor (maltaza, lactaza, salicinaza, celobiaza, invertaza, trehalaza și amilaza), precum și unele oxidoreductaze (catalaza, alcooldehidrogenaza și lactatdehidrogenaza) în strînsă corelație cu procesele de digestie și cu absorbția produșilor rezultați în urma acțiunii enzimelor la nivelul diferitelor segmente ale tubului digestiv de cobai. S-a emis ipoteza că există două situsuri distincte de absorbție a celor doi anomeri ai glucozei și că în stomacul cobailor tineri are loc cu cca mai mare viteză hidroliza lactozei din lapte. Activitatea arilesterazei, maximă în cecum, este corelată cu funcția de apărare a enzimei contra endotoxinelor bacteriene și cu procesele de turnover ale lipidelor membranare. Activitățile specifice enzimelor studiate sînt corelate cu procesele metabolice caracteristice fiecărui segment al tubului digestiv.

Macromoleculele ingerate odată cu hrana sînt scindate înainte de absorbția lor la nivelul intestinului subțire, sub acțiunea enzimelor secretate de diferite glande digestive și deversate în tractul digestiv. Această reprezentare despre procesul digestiei a fost susținută ulterior de un număr mare de studii dedicate elucidării mecanismelor de absorbție și transport, la nivelul epiteliului intestinal, ale monozaharidelor, acizilor grași, aminoacizilor, vitaminelor etc. (1), (2), (3), (4). În literatura de specialitate există studii (3), (4), (5) care atestă prezența unor enzime cu acțiune hidrolitică și în celulele epiteliale ale intestinului subțire. În ultimii ani s-au acumulat multe dovezi care indică faptul că mucoasa intestinală este foarte activă metabolic (6), (7) în hidroliza intracelulară a substanțelor din hrană (8). Miller și Crane (9) au demonstrat hidroliza, sub acțiunea enzimelor din mucoasa intestinală, a zaharozei, maltozei și glucozo-1-fosfatului, iar Newey și Smyth (10) au evidențiat faptul că dipeptidele pătrund în celulele mucoasei, unde sînt hidrolizate înainte de a trece ca aminoacizi în circulația sanguină. Studii de microscopie electronică și de fluorescență (10), (11), (12), (13), (14) au precizat că anumite tipuri de celule, inclusiv celulele epiteliale și cele ale mucoasei intestinale, au capacitatea de a realiza pinocitoza macromoleculelor. Celulele active în pinocitoză sînt, de asemenea, bogate în lizozomi, formațiuni implicate în digestia materialului pinocitat și în turnoverul constituenților intracelulari. În literatură există lucrări izolate care evidențiază prezența unor hidrolaze acide în mucoasa intestinală. Astfel, fosfataza acidă a fost sem-

nalată de mai mulţi autori (15), (16), (17), β-galactozidaza de Doell şi Kretchmer (18), RN-aza acidă de Lamirande şi Allard (19). Hsu şi Tappel (20) au studiat şase enzime lizozomale din mucoasa intestinală de şobolan : fosfataza acidă, RN-aza acidă, β-galactozidaza, β-glucuronidaza, arilsulfataza şi catepsinele, făcînd aprecieri asupra rolului acestor enzime în digestia intracelulară a unor molecule. De un interes special sînt β-glucuronidaza, arilsulfataza şi β-galactozidaza, care au ca substrate condroitinsulfaţii, heparina şi alte mucopolizaharide ce se găsesc în mucusul care căptuşeşte partea luminală a intestinului, deci participă la turnoverul rapid al epiteliului mucoasei intestinale. Formaţiunea morfologică denumită bordura în perie conţine un număr de hidrolaze acide (fosfataza acidă, ribonucleaza acidă, fosfoproteinfosfataza), o hidrolază neutră (arilamidaza) şi hidrolaze alcaline (fosfataza alcalină şi ribonucleaza alcalină). Majoritatea acestor enzime se găsesc localizate în mai multe tipuri de celule din peretele tractului digestiv (21). În microvilii celulelor mucoasei intestinului subţire a fost identificat un număr de hidrolaze, printre care invertaza, leucil-β-naftilamidaza şi fosfataza alcalină (22). Takesue (23) purifică leucil-β-naftilamidaza pînă la omogenitate moleculară din membranele microvililor intestinului subţire de iepure, iar Fosset şi colab. (24), (25) purifică fosfataza alcalină din intestin de viţel şi o caracterizează din punct de vedere molecular şi cinetic.

Kawai şi Morotoni (26) au studiat comparativ o serie de enzime intestinale la şobolanii „germfree", convenţionali şi gnotobiotici, remarcînd că activitatea acestora este puternic represată în prezenţa microorganismelor care pătrund în partea superioară a intestinului subţire.

În lucrarea de faţă ne-am propus să studiem localizarea de-a lungul tractului digestiv a unor enzime implicate în sistemele de transport activ, în glicoliză şi digestie. În acest scop am studiat repartiţia unor enzime legate de metabolismul fosforului (RN-aza acidă, fosfataza acidă şi alcalină şi ATP-aza), al acizilor graşi (arilesteraza), al glucidelor (maltaza, lactaza, salicinaza, celobiaza, invertaza, trehalaza şi amilaza), precum şi unele oxidoreductaze (catalaza, alcooloxidoreductaza şi lactatdehidrogenaza) în strînsă corelaţie cu procesele de digestie şi cu absorbţia produşilor rezultaţi în urma acţiunii enzimelor la nivelul diferitelor segmente ale tubului digestiv de cobai.

MATERIAL ŞI METODE

Imediat după sacrificarea cobailor în vîrstă de 14 zile s-au prelevat cele cinci segmente ale tubului digestiv : stomacul, jejunul, ileumul, cecumul şi colonul, care au fost spălate de cîteva ori cu soluţie Ringer şi conservate în congelator (la −20°C). În momentul determinărilor, pentru extracţia enzimelor a fost mojarat 1 gram de ţesut în prezenţa a 10 ml soluţie deoxicolat de sodiu 0,05%. Omogenatele rezultate au fost ţinute la 4°C timp de o oră, după care au fost centrifugate la 7 000 rpm timp de 10 min. În supernatante s-au studiat activităţile enzimatice.

Activitatea ribonucleazei acide a fost dozată după metoda descrisă de De Duve şi colab. (27) şi adaptată la condiţiile concrete, optimizate, pentru experimentul nostru (28). Activitatea specifică a fost exprimată în U/mg proteină/min/37°C.

Activitatea fosfatazei acide (EC 3.1.3.2) a fost dozată urmărindu-se hidroliza p-nitrofenilfosfatului la pH 4,8 (29). Activitatea specifică a fost exprimată în mU/mg proteină/min / 55°C.

Activitatea fosfatazei alcaline (EC 3.1.3.1) a fost dozată urmărindu-se hidroliza p-nitrofenilfosfatului la pH 8,2 și în prezența Mg^{2+} (30). Activitatea specifică a fost exprimată în U/mg proteină/min/50°C.

Activitatea ATP-azei (EC 3.6.1.8) a fost dozată prin determinarea ortofosfatului eliberat în urma acțiunii enzimei, prin metoda Fiske-Subbarow (31). Mediul de reacție a avut un volum final de 4 ml și conținea 1,6 μmoli ATP, 3 μmoli $MgCl_2$, 0,5 μmoli KCl, 0,5 μmoli NaCl, preparate într-o soluție tampon Tris-HCl 0,01 M, pH 7,2, și extractul enzimatic. Activitatea specifică a ATP-azei a fost exprimată în U/mg proteină/min/37°C.

Activitatea arilesterazei (EC 3.1.1.2) a fost determinată după metoda Nachlas și Seligman (32), mediul de reacție conținînd, într-un volum final de 1,1 ml, 0,1 mg β-naftilacetat, preparat în tampon Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4, și extractul enzimatic. β-Naftolul eliberat a fost cuplat cu Fast Blue B și produsul format a fost colorimetrat la 540 nm. Activitatea specifică arilesterazei a fost exprimată în U/mg proteină/min/37°C.

Activitatea dizaharidazelor a fost dozată după Petterson și Porath (33), determinîndu-se zaharurile reducătoare eliberate cu reactiv dinitrosalicilic. Mediul de reacție, cu un volum final de 2,2 ml, conținea, în funcție de dizaharidaza izolată, un anumit dizaharid (maltoza, lactoza, salicina, celobioza, zaharoza sau trehaloza) într-o concentrație de 1,5 μmol în soluție tampon acetat 0,1 M, pH 5 și preparatul enzimatic. Au fost cercetate prezența și activitatea următoarelor dizaharidaze: maltaza, lactaza, salicinaza, celobiaza, invertaza, trehalaza. Activitatea specifică dizaharidazelor a fost exprimată în μmoli glucoză/mg proteină/min/37°C.

Activitatea amilazei (EC 3.2.1.1) a fost determinată cu reactiv dinitrosalicilic, conform metodei descrise de Bernfeld (34), utilizîndu-se ca substrat amidonul. Activitatea specifică amilazei a fost exprimată în μmoli maltoză/mg proteină/min/37°C.

Activitatea lactatdehidrogenazei (EC 1.1.1.27) a fost dozată urmărindu-se scăderea extincției la 340 nm, într-un mediu de reacție (3 ml) care conținea preparatul enzimatic, NADH (0,28 μmoli), piruvat (1,8 μmoli) în tampon fosfat 0,1 M, pH 7. Activitatea specifică s-a exprimat în unități (ΔE_{340}/mg proteină/min/25°C).

Activitatea alcooldehidrogenazei (EC 1.1.1.1) a fost determinată după metoda descrisă de Vallee și Hoch (35), urmărindu-se creșterea extincției la 340 nm, într-un mediu de reacție cu un volum final de 3 ml și care conținea preparatul enzimatic, NAD^+ (6,8 μmoli) și etanol (0,4 mmoli) în tampon fosfat 0,1 M, pH 7. Activitatea specifică s-a exprimat în unități (ΔE_{340}/mg proteină/min/25°C).

Activitatea catalazei (EC 1.11.1.6) a fost dozată conform metodei elaborate de Beers și Sizer (36), urmărindu-se scăderea extincției la 240 nm într-un mediu de reacție conținînd preparatul enzimatic și H_2O_2 (42 μmoli) în soluție tampon fosfat 0,05 M, pH 7. Activitatea specifică s-a calculat utilizîndu-se formula:

$$\frac{\Delta E_{240nm}/\text{min} \times 1\,000}{43{,}6 \times \text{mg/ml proteină}} = \text{U/mg proteină/min/25°C},$$

unde 43,6 este coeficientul de extincție molară.

Concentrația proteică a fost determinată în toate cazurile prin metoda Lowry și colab. (37), în vederea exprimării rezultatelor sub formă de activități specifice.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În figura 1 se prezintă repartiția RN-azei acide în cele cinci segmente ale tubului digestiv de cobai. Se constată, în condițiile de extracție prezentate, că cea mai mare activitate specifică este decelată în cecum, după care urmează jejunul și ileumul, unde activitatea enzimei reprezintă 34,6%, apoi stomacul și colonul, în care se găsesc numai 26,9% din activitatea maximă a enzimei din cecum. Aceste rezultate atestă, în cazul tubului digestiv de cobai, un catabolism puternic exprimat al acizilor ribonucleici la nivelul cecumului. Studii mai detaliate au arătat prezența mai multor forme moleculare ale RN-azei acide, cu mase moleculare și parametri cinetici diferiți, în acest segment al tubului digestiv, cecumul (28).

Fosfataza acidă este o enzimă implicată în catabolizarea intracelulară a esterilor fosforici, în scopul eliberării de grupări ortofosfat necesare refacerii fondului celular de fosfat anorganic şi biosintezei de ATP, compus macroergic implicat în biosinteza proteinelor, în transportul

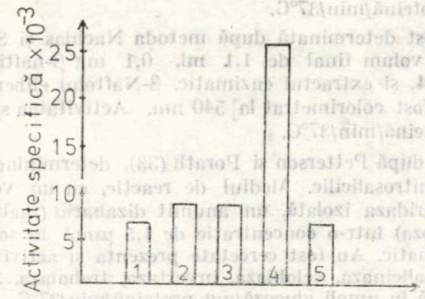


Fig. 1. — Repartiţia RN-azei acide în diferite segmente ale tubului digestiv de cobai : 1, stomac ; 2, jejun ; 3, ileum ; 4, cecum ; 5, colon.

activ şi în permanenta reînnoire a bordurii în perie de la nivelul intestinului subţire. Cea mai mare activitate specifică fosfatazei acide a fost găsită în jejun, iar cea mai mică în stomac (reprezentînd numai 25,27% din valoarea maximă). În celelalte segmente ale tubului digestiv, activitatea specifică a enzimei creşte de la ileum spre colon (fig. 2), în acest ultim segment al tubului digestiv activitatea specifică fosfatazei acide reprezentînd mai mult de jumătate (55%) din cea evidenţiată în jejun.

Fosfataza alcalină este una dintre enzimele intestinale cele mai active, avînd la acest nivel un rol complex, fiind implicată în absorbţia fosfatului. În jejun şi ileum au fost decelate cele mai mari cantităţi de

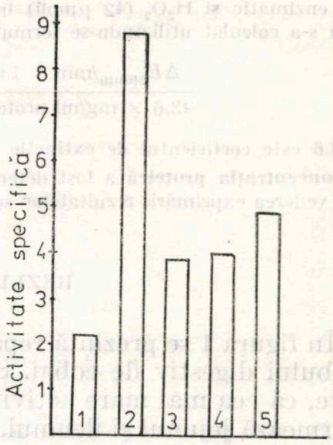


Fig. 2. — Activitatea specifică a fosfatazei acide în extractele proteice totale obţinute din diferite segmente ale tubului digestiv de cobai : 1, stomac ; 2, jejun ; 3, ileum ; 4, cecum ; 5, colon.

enzimă (fig. 3), activităţi mai mici fiind determinate în stomac (2,75%) şi în colon (1,54%).

În figura 4 prezentăm repartiţia $Na^+—K^+$—ATP-azei Mg^{2+} dependente în diferite segmente ale tubului digestiv de cobai. Se constată că cea mai mare activitate enzimatică de scindare a ATP, în condiţiile ex-

perimentale optimizate, se determină în ileum (100%), apoi în colon (94,7%), jejun (76%) și cecum (69,27%). O activitate minimă (30,5%) este găsită în stomac. Activitatea ATP-azei, prezentă în toate segmentele tubului digestiv, trebuie corelată cu transportul activ de Na^+ și K^+, cu

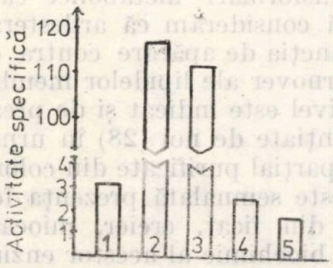


Fig. 3. — Distribuția fosfatazei alcaline în peretele diferitelor segmente ale tubului digestiv de cobai: 1, stomac; 2, jejun; 3, ileum; 4, cecum; 5, colon.

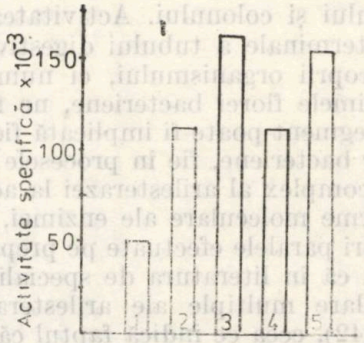
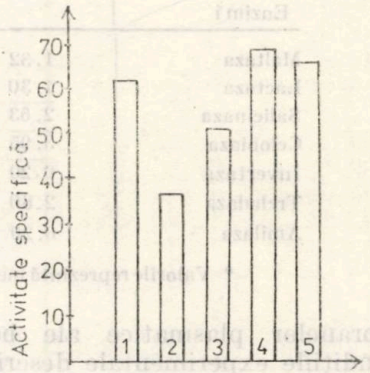


Fig. 4. — Activitatea specifică Na^+—K^+ — ATP-azei Mg^{2+} dependente în diferite segmente ale tubului digestiv de cobai: 1, stomac; 2, jejun; 3, ileum; 4, cecum; 5, colon.

procesele secreției de acid clorhidric în stomac și cu transportul activ al produșilor finali ai digestiei — glucoza, galactoza, unii aminoacizi etc. Deși în unele segmente ale tubului digestiv, de exemplu în colon, nu există activități digestive proprii cu importanță fiziologică pentru organism, activitatea Na^+—K^+—ATP-azei Mg^{2+} dependente la acest nivel este mare datorită capacității absorbtive cunoscute a mucoasei colonului pentru apă, elemente minerale, unele vitamine (4) și posibil a unor metaboliți rezultați din activitatea fiziologică a florei bacteriene din colon.

Fig. 5. — Activitatea arilesterazei în extractele proteice totale obținute din stomacul (1), jejunul (2), ileumul (3), cecumul (4) și colonul (5) de cobai.



Arilesteraza catalizează reacții de hidroliză a esterilor acizilor grași cu catenă lungă și reacții de transesterificare, având rol în transportul acizilor grași liberi, de apărare contra endotoxinelor etc. În figura 5 prezentăm activitățile specifice arilesterazei din cele cinci segmente ale tubului

digestiv de cobai. Cele mai mari activităţi specifice au fost evidenţiate în extractele proteice din cecum (100%), colon (96,4%), stomac (93,25%) şi ileum (74,7%), o activitate minimă fiind găsită în jejun (55,3%). În segmentele tubului digestiv de cobai analizate de noi surprind activităţile specifice deosebit de mari ale arilesterazei de la nivelul stomacului, cecumului şi colonului. Activitatea maximă a acestei enzime la nivelul părţii terminale a tubului digestiv, acolo unde nu există procese digestive proprii organismului, ci numai transformări metabolice catalizate de enzimele florei bacteriene, ne face să considerăm că arilesteraza din acest segment poate fi implicată fie în funcţia de apărare contra endotoxinelor bacteriene, fie în procesele de turnover ale lipidelor membranare. Rolul complex al arilesterazei la acest nivel este indicat şi de prezenţa a trei forme moleculare ale enzimei, evidenţiate de noi (28) în urma unor cercetări paralele efectuate pe preparate parţial purificate din colon. Menţionăm că în literatura de specialitate este semnalată prezenţa formelor moleculare multiple ale arilesterazelor din ficat, creier, miocard etc. (38)—(42), ceea ce indică faptul că rolul biochimic al acestor enzime este complex şi în prezent puţin cunoscut.

În tabela 1 prezentăm repartiţia unor dizaharidaze şi a amilazei în tubul digestiv de cobai. În jejun s-a găsit maximul activităţilor maltazei, invertazei, trehalazei, care în urma hidrolizei substratelor eliberează α-glucoză. În stomac s-a evidenţiat maximul de activitate a lactazei, salicinazei şi celobiazei, care prezintă ca produşi de reacţie β-glucoza şi β-galactoza. De menţionat că în literatura de specialitate lactaza este considerată a fi localizată în exclusivitate în glicocalixul din structura

Tabela 1

Activităţile specifice (μmoli glucoză/mg proteină/min/37°C) ale unor dizaharidaze şi ale amilazei din diferite segmente ale tubului digestiv de cobai *

Segment / Enzimi	Stomac	Jejun	Ileum	Cecum	Colon
Maltaza	1,32	4,25	2,57	0,53	1,65
Lactaza	1,30	0,25	0,38	0,56	0,61
Salicinaza	2,63	1,26	1,11	0,87	0,90
Celobiaza	3,95	1,73	1,48	2,05	0,18
Invertaza	0,20	67,55	48,11	0	0
Trehalaza	2,60	29,66	20,72	2,50	2,70
Amilaza	0,20	0,63	0,34	0,32	0,53

* Valorile reprezintă media a 10 determinări.

membranelor plasmatice ale bordurii în perie din intestin (4). Noi, în condiţiile experimentale descrise, am găsit maximul de activitate de hidroliză a lactozei în stomac (100%) şi capacităţi catalitice inferioare în colon (46,9%), cecum (43%), ileum (29,2%) şi jejun (19,2%). Prezenţa unei puternice activităţi de hidroliză a lactozei în stomacul animalelor tinere (de 14 zile) poate fi corelată cu procesele de degradare a cazeinei, care sînt deosebit de intense în stomac (42). Nu este exclus ca şi compo-

nentele glucidice ale laptelui, în principal lactoza, să fie hidrolizate cu maximă eficienţă la nivelul acestui segment al tubului digestiv. Faptul că la nivelul stomacului s-au evidenţiat activităţi enzimatice maxime, care conduc la eliberare de β-glucoză, iar în jejun-ileum capacităţi maxime ale unor enzime care hidrolizează dizaharide cu formare de α-glucoză suge-

Tabela 2

Activităţile specifice (U/mg proteină/min/25°C) ale unor oxidoreductaze din diferite segmente ale tubului digestiv de cobai*

Enzimă \ Segment	Stomac	Jejun	Ileum	Cecum	Colon
Catalaza	2,80	0,83	1,48	1,21	0,71
Alcooldehidrogenaza	0,17	0,05	0,02	0,06	0,04
Lactatdehidrogenaza	1,43	0,91	0,66	2,50	2,70

* Valorile reprezintă media a 10 determinări.

rează că cei doi anomeri ai glucozei au situsuri de absorbţie diferite. Dacă β-glucoza se absoarbe în principal la nivelul mucoasei stomacale, funcţia ATP-azei din aceste celule este mai complexă decît cea presupusă în prezent în literatura de specialitate (4). În cecum şi colon sînt evidenţiate toate activităţile dizaharidazelor studiate, cu excepţia invertazei, localizată prioritar în partea superioară a intestinului subţire.

În tabela 2 prezentăm repartiţia în cele cinci segmente ale tractului digestiv de cobai a trei oxidoreductaze implicate, pe de o parte, în procesele de fermentaţie anaerobă (alcool- şi lactatdehidrogenazele) şi, pe de altă parte, în importante mecanisme oxidative care decurg cu formare de peroxid de hidrogen, metabolit toxic îndepărtat rapid din celulă sub acţiunea catalazei. Este interesantă observaţia că alcooldehidrogenaza şi lactatdehidrogenaza nu au o repartiţie similară. Astfel, alcooldehidrogenaza are o activitate specifică maximă la nivelul stomacului, iar lactatdehidrogenaza la nivelul cecumului şi colonului. De asemenea, în extractul proteic total obţinut din stomac se determină o activitate lactatdehidrogenazică ridicată. Tot la acest nivel se înregistrează maximul de activitate specifică a catalazei, valoarea minimă fiind determinată în ultima parte a tubului digestiv. În colon, activităţile maxime pentru lactatdehidrogenază şi minime pentru catalază pot fi corelate cu transformările metabolice de tip anaerob caracteristice fermentaţiilor bacteriene. Activităţile maxime ale alcooldehidrogenazei şi catalazei din stomac pot fi corelate cu concentraţiile crescute ale substratelor acestor enzime, rezultate în urma transformărilor metabolice caracteristice acestui segment al tubului digestiv.

CONCLUZII

1. În cecumul de cobai se determină maximul activităţii specifice RN-azei acide, în timp ce în jejun-ileum se evidenţiază 34,6% şi în stomac-colon numai 26,9% din activitatea maximă. Această distribuţie este corelată cu turnoverul ARN.

2. Fosfataza acidă prezintă cea mai mare activitate specifică (100 %) în jejunul de cobai și cea mai mică (25,27 %) în stomac. Enzima este implicată în catabolizarea intracelulară a esterilor fosforici, în scopul refacerii fondului celular de fosfat anorganic și biosintezei ATP.

3. Cele mai mari activități specifice ale fosfatazei alcaline au fost determinate în jejunul și ileumul de cobai, iar cea mai mică în colon (1,54 % din activitatea maximă). Rezultatele experimentale sugerează că în porțiunea superioară a intestinului subțire au loc procesele de absorbție ale fosfaților cu viteze maxime.

4. În toate segmentele tubului digestiv de cobai s-a decelat o intensă activitate specifică $Na^+—K^+—ATP$-azei Mg^{2+} dependente, valorile maxime fiind evidențiate în ileum și colon, iar valoarea minimă în stomac. Această repartiție a ATP-azei a fost corelată cu secreția de acid clorhidric din stomac, cu procesele de transport activ și de absorbție a produșilor de digestie din intestinul subțire și cu marea capacitate de absorbție a mucoasei colonului.

5. Activități arilesterazice mari au fost evidențiate în cecum (100 %), colon (96,4 %) și stomac (93,25 %) și au fost corelate cu funcția de apărare contra endotoxinelor bacteriene, cu procesele de turnover ale lipidelor membranare, cu hidroliza esterilor acizilor grași și cu transportul produșilor de hidroliză.

6. În stomacul cobailor tineri (de 14 zile) se depistează activități maxime ale lactazei, salicinazei și celobiazei, iar în porțiunea jejun-ileum capacități catalitice maxime de hidroliză ale zaharozei, trehalozei, maltozei și amidonului. Luînd în considerație natura produșilor de hidroliză, datele experimentale sugerează situsuri diferite de absorbție a celor doi anomeri ai glucozei. Maximul activității lactazei este corelat cu degradarea cazeinei în stomacul animalelor tinere.

7. Studiul unor oxidoreductaze indică repartiția diferită a alcooldehidrogenazei și lactatdehidrogenazei în tubul digestiv de cobai. În extractele proteice din stomac se determină activități specifice maxime pentru catalază și alcooldehidrogenază și o intensă activitate a lactatdehidrogenazei. În cecum și colon, activitatea lactatdehidrogenazei este maximă, fiind corelată cu transformările de tip anaerob, care caracterizează fermentațiile bacteriene.

Prezentat la redacție
la 18 octombrie 1983

Facultatea de biologie,
Catedra de biochimie,
București, Splaiul Independenței nr. 91—95

DISTRIBUTION OF SOME ENZYMES IN VARIOUS SEGMENTS OF THE GUINEA PIG DIGESTIVE TRACT

SUMMARY

Localization at the level of the digestive tract of young guinea pigs (of 14 days) of some enzymes implied in the active transport systems, in the glycolysis and in the digestion was studied. Thus, the dis-

tribution of some enzymes from the phosphorus metabolism, i.e. acid RN-ase, acid and alkaline phosphatases and ATP-ase, from the fatty acid metabolism, i.e. arylesterase and from the carbohydrate metabolism, i. e. maltase, lactase, salicinase, cellobiase, invertase, trehalase and amylase as well as some oxidoreductases, e. g. catalase, alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase were studied in close correlation with digestive processes and with the absorption of the products resulted as an effect of the enzymes action at the level of different segments of the guinea pig digestive tract. A hypothesis was advanced that there exist two distinct absorption sites of the two glucose anomers and that the lactose hydrolysis from milk occurs with the highest rate in the stomach of young guinea pigs. The maximum arylesterase activity in the cecum is correlated with the defence function of the enzyme against bacterial endotoxins and with the turnover processes of membrane lipids. The specific activities of studied enzymes are correlated with the metabolic processes specific to each segment of the digestive tract.

BIBLIOGRAFIE

1. M. FLORKIN, *Introduction à la biochimie générale*, Masson & Cie, Paris, 1946.
2. J. B. KIRSNER, C. S. VINANS, *The stomach*, in *Pathologic physiology mechanisms of disease*, sub red. W. A. SODEMAN, TH. M. SODEMAN, W. B. Saunders Comp., London—New York, 1979, p. 798.
3. D. W. WATSON, W. A. SODEMAN, *The small intestine*, in *Pathologic physiology mechanisms of disease*, sub red. W. A. SODEMAN, TH. M. SODEMAN, W. B. Saunders Comp., London—New York, 1979, p. 824.
4. L. R. JOHNSON, *Gastrointestinal physiology*, C. V. Mosby Comp., Londra, 1981, p. 103.
5. E. H. STARLING, *Mercer's Company lectures on recent advances in the physiology on digestion*, New York, 1911, p. 127.
6. R. P. SPENCER, W. E. KONN, Fed. Proc., **19**, 886 (1960).
7. N. ZANCHECK, Fed. Proc., **19**, 855 (1960).
8. H. A. PADYKULA, Fed. Proc., **21**, 873 (1962).
9. D. MILLER, R. K. CRANE, Amer. J. clin. Nutr., **12**, 220 (1963).
10. H. NEWEY, D. H. SMYTH, J. Physiol., **152**, 367 (1960).
11. H. HOLTER, H. HOLZER, Exp. Cell Res., **18**, 421 (1959).
12. S. O. CLARK, J. Biophys. Biochem. Cytol., **5**, 41 (1959).
13. W. STRAUS, J. Biophys. Biochem. Cytol., **4**, 541 (1958).
14. S. L. PALAY, L. J. KARLIN, J. Biophys. Biochem. Cytol., **5**, 373 (1959).
15. E. W. DEMPSEY, H. W. DEANE, J. Cell comp. Physiol., **27**, 159 (1946).
16. H. SHELDON, H. ZELTERQVIST, D. BRANDES, Exp. Cell Res., **9**, 592 (1955).
17. H. A. PADYKULA, E. W. STRAUSS, A. J. LADMAN, F. H. GARDNER, Gastroenterology, **40**, 735 (1962).
18. R. G. DOELL, N. KRETCHMER, Biochim. biophys. Acta, **62**, 353 (1962).
19. G. DE LAMIRANDE, C. ALLARD, Ann. N. Y. Acad. Sci., **81**, 570 (1959).
20. L. HSU, A. L. TAPPEL, J. Cell Biol., **23**, 233 (1964).
21. G. HÜBSCHER, G. R. WEST, D. N. BRINDLEY, Biochem. J., **97**, 629 (1965).
22. R. K. CRANE, Fed. Proc., **28**, 5 (1969).
23. Y. TAKESUE, J. Biochem., **77**, 103 (1975).
24. M. FOSSET, D. CHAPPELET-TORDO, M. LAZDUNSKI, Biochemistry, **13**, 1783 (1974).
25. D. CHAPPELET-TORDO, M. FOSSET, M. IWATSUBO, C. GACHE, M. LAZDUNSKI, Biochemistry, **13**, 1788 (1974).
26. Y. KAWAI, M. MOROTONI, Infect. Immun., **19**, 771 (1978).
27. C. DE DUVE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX, F. APPELMANS, Biochem. J., **60**, 604 (1955).

28. DANA IORDĂCHESCU, I. F. DUMITRU, V. DIMA, A. M. IANCU, Rev. roum. Biochim., **21**, 33 (1984).
29. O. H. LOWRY, Methods Enzymol., **4**, 371 (1957).
30. N. BROCK, H. J. HOHORST, B. SCHNEIDER, H. WILMANNS, Arzneimittelforschung, **14**, 762 (1964).
31. C. FISKE, Y. SUBBAROW, J. biol. Chem., **66**, 375 (1925).
32. M. M. NACHLAS, A. M. SELIGMAN, J. natl. Cancer Inst., **9**, 415 (1949).
33. G. PETTERSON, J. PORATH, Biochim. biophys. Acta, **67**, 9 (1963).
34. P. BERNFELD, Adv. Enzymol., **12**, 379 (1951).
35. B. L. VALLEE, F. L. HOCH, Proc. natl. Acad. Sci. USA, **41**, 327 (1955).
36. R. F. BEERS, I. W. SIZER, J. biol. Chem., **195**, 133 (1952).
37. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. A. FARR, R. J. RANDALL, J. biol. Chem., **193**, 165 (1951).
38. J. PAUL, P. FOTTRELL, Biochem. J., **78**, 418 (1961).
39. J. PAUL, P. FOTTRELL, Ann. N. Y. Acad. Sci., **94**, 668 (1961).
40. K. D. BARRON, J. BERNSOHN, A. R. HESS, J. Histochem. Cytochem., **9**, 656 (1961).
41. N. KINGSBURY, C. J. MASTERS, Biochim. biophys. Acta, **200**, 58 (1970).
42. V. R. NIKOLAEVSKAYA, M. P. CERNIKOW, Vopr. pitania, **4**, 43 (1982).

INTERACȚIUNI DE TIP PROTEINĂ-PROTEINĂ ÎNTRE SUBUNITĂȚILE COMPONENTE ALE FACTORULUI DE CREȘTERE A NERVULUI

ELENA GANEA, RODICA BÎRNESCU

Rezumat. Subunitățile α, β și γ componente ale factorului de creștere a nervului (NGF) au fost separate și purificate prin cromatografia pe CM-celuloză a NGF izolat și purificat din glandele submaxilare. Interacțiunile dintre cele trei clase de subunități s-au urmărit prin determinarea activității argininesteropeptidazice a subunității γ în prezența subunităților α, β și α + β. Rezultatele au demonstrat scăderea activității enzimatice a subunității γ atît în prezența subunităților α, respectiv β, cît și în cadrul complexului 7S NGF, în tampon TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,4. Demonstrarea unei activități mai mari a γ-enzimei în prezența subunităților α+β decît a α, respectiv β, sugerează existența în complexul NGF a unor interacțiuni de tip proteină-proteină între α-β sau α-γ și β-γ, importante pentru evidențierea centrului activ al enzimei.

Studii anterioare efectuate în cadrul laboratorului nostru au demonstrat existența unor interacțiuni de tip proteină-proteină între diferite enzime proteolitice și substratele lor în primele minute de incubare. Astfel de interacțiuni s-au semnalat în cursul procesului de degradare a imunoglobulinei G și a hemoglobinei umane de către catepsină (1), a β-glucozidazei de către catepsina B_1 (2), precum și a catepsinei B_1 umane de către tripsină (3).

Factorul de creștere a nervului (7S NGF) este un complex format din trei subunități polipeptidice distincte, cu greutăți moleculare cuprinse între 20 000 și 30 000 fiecare, aflate în raportul 2 : 1 : 2, structura complexului fiind $\alpha_2\beta\gamma_2$. Deoarece fiecare subunitate este ea însăși un dimer, asamblarea și interacțiunile din cadrul 7S NGF sînt foarte complexe. Activitatea biologică specifică a 7S NGF, și anume cea de dezvoltare, menținere și regenerare a neuronilor simpatici și senzitivi, se datorește subunității β, în timp ce subunitatea γ posedă o activitate esterazică ce ar putea transforma precursorul pro-β în specii active; pentru subunitatea α nu s-a descoperit încă un rol biologic sau enzimatic bine stabilit.

Cele trei tipuri de subunități sînt legate necovalent în complexul 7S NGF, acesta putînd fi disociat în părțile componente sau intermediarii lor. Stabilitatea maximă a complexului este la pH 6,8, disocierea completă în subunități avînd loc sub pH 4 și peste pH 10 (4). Disocierea în mediu acid se face treptat, și anume între pH 4 și 5 s-au observat simultan specii de 7,1S, 4,8S și 2,5S. Între pH 7,4 și 7,6 apare o disociere simetrică în specii avînd greutatea moleculară jumătate din cea a complexului, corespunzînd probabil formulei $\alpha\beta_{1/2}\gamma$. Aceasta probabil deoarece și β este un dimer și poate fi disociat în două lanțuri polipeptidice a cîte 13 000 greutate moleculară.

St. cerc. biochim., 27, 1, 49–56 (1984)

În mediul alcalin, disocierea este mai complexă.

Prezența ionilor de Zn^{2+} legați de 7S NGF pare a avea de asemenea un rol important în stabilizarea complexului. Îndepărtarea lor prin chelare influențează modul de disociere a 7S NGF și activitatea γ-esterazică (5).

NaCl modifică echilibrul complexului, și anume creșterea tăriei ionice conduce la transformarea 7S NGF în specii de greutate moleculară mai mică, cu viteză de sedimentare mai mică, simultan cu scăderea masei de specii cu viteză de sedimentare mai mare (4).

Disocierea produsă de NaCl conduce la formarea unor intermediari diferiți de cei obținuți în prezență de EDTA sau prin diluție și modificarea pH-ului.

Studierea disocierii complexului 7S în subunități sau intermediari ajută la cunoașterea interacțiunilor existente în cadrul complexului și implicit a proprietăților biologice ale acestuia. Lucrarea de față urmărește modificarea proprietăților enzimatice ale factorului de creștere a nervului ca urmare a interacțiunilor dintre subunitățile componente.

MATERIALE ȘI METODE

Izolarea și purificarea 7S NGF. Factorul de creștere a nervului s-a izolat din glandele submaxilare de șoareci masculi adulți (Swise albino) și s-a purificat după metoda descrisă de Varon și colab. (6).

Separarea subunităților α, β și γ din NGF. 7S NGF a fost separat în subunitățile α, β și γ prin cromatografie pe CM-celuloză, după metoda lui Smith și colab. (7). În acest scop, cel de-al doilea pisc obținut la cromatografia pe DEAE-celuloză a fost concentrat și dializat față de tampon acetat 0,05 M, pH 4, conținînd NaCl 0,15 M. Eluția s-a realizat cu același tampon, în gradient discontinuu de NaCl, și anume : NaCl 0,15 M, NaCl 0,4 M și NaCl 2 M.

Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă. Subunitățile NGF separate prin cromatografie pe CM-celuloză au fost concentrate și caracterizate prin disc-electroforeză în poliacrilamidă în mediu alcalin, după metoda lui Davis (8). Proteina a fost colorată cu o soluție de amidoblack 1 % în acid acetic, decolorarea gelurilor realizîndu-se cu acid acetic 3 %.

Determinarea activității enzimatice a NGF. Activitatea esteropeptidazică a 7S NGF și a subunităților sale s-a determinat pe substrat TAME (p-toluen sulfonil-L-arginină-metilester clorhidrat) după metoda Young (9). Probe de 30 μg NGF purificat sau cîte 10 μg proteină α, β sau γ în 1 ml tampon TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,4 s-au incubat 0—60 min în prezența a 20 μl TAME 0,01 M. Incubarea s-a efectuat la 25°C. S-a înregistrat modificarea absorbției la 247 nm față de proba martor conținînd 20 μl substrat în același tampon, ca și față de proba de enzimă în absența substratului. Citirile s-au făcut la fiecare 5 min.

Determinarea interacțiunilor dintre subunitățile NGF. Alicote conținînd cîte 10 μg proteină α și, respectiv, β în tampon TRIS-HCl 0,05 M, pH 7,4 s-au adăugat la o cantitate egală de proteină γ și s-a determinat activitatea enzimatică pe TAME după cum s-a descris anterior, paralel cu activitatea subunității γ singure, în aceleași condiții de incubare.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Separarea subunităților α, β și γ ale NGF. Factorul de creștere a nervului, preparat și purificat prin gel-filtrare pe Sephadex și prin cromatografie pe DEAE-celuloză, a fost separat în subunitățile componente α, β și γ prin cromatografie pe CM-celuloză.

Reprezentarea grafică a curbei de extincție la 280 nm, obținută la separarea NGF pe CM-celuloză, este redată în figura 1. Se observă cele trei

piscuri proteice majore corespunzînd subunităților α, γ și, respectiv, β. Cu cel de-al doilea gradient, subunitatea γ se eluează sub forma a două piscuri principale, spre deosebire de metoda originală, unde se observă un singur pisc. Rezultatul obținut de noi se poate explica prin hetero-

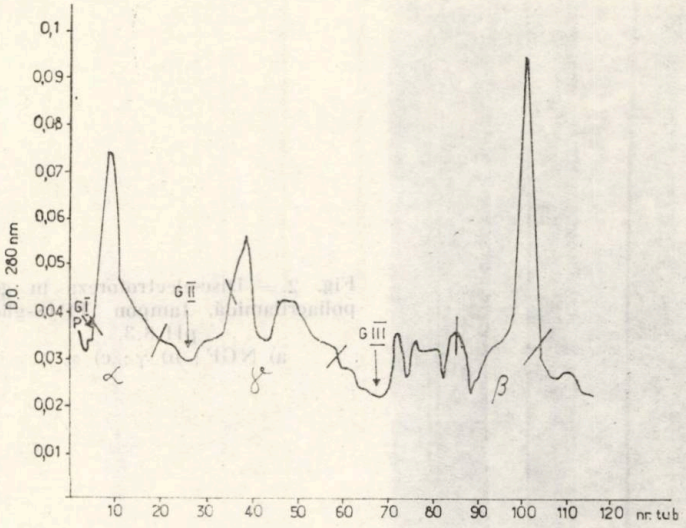


Fig. 1. — Cromatografia pe o coloană de CM-celuloză (18 × 1,5 cm) a piscului II obținut la cromatografia pe DEAE-celuloză (9 mg proteină). Viteza de eluție = 17 ml/oră ; volumul fracțiunilor colectate = 1 ml/tub. Eluant, tampon acetat 0,05 M, pH 4.

genitatea acestei subunități, pentru care Smith și colab. (7) au demonstrat la disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă în tampon TRIS-tricinat pH 8,3 existența a trei componente. Randamentul obținut pentru cele trei subunități a fost : 0,21% pentru α, 0,49% pentru β și 0,6% pentru γ.

Caracterizarea electroforetică a subunităților separate prin cromatografie pe schimbători de ioni este ilustrată în figura 2. Se observă cîte o bandă bine definită, datorită produselor purificate. Subunitatea γ prezintă o viteză de migrare asemănătoare complexului 7S NGF, în timp ce subunitatea α, acidă, migrează mai mult spre anod. Subunitatea β nu a putut fi evidențiată în condițiile noastre de lucru. Ea a fost evidențiată de Smith și colab. (7) în tampon β-glicinat de Na pH 10,3, unde migrează asemănător cu banda proteică corespunzătoare 7S NGF din experimentul de față.

Studiul interacțiunilor dintre subunitățile α, β și γ. Interacțiunile dintre cele trei clase de subunități (α, β și γ) ale NGF s-au urmărit prin determinarea influenței subunităților α și β asupra activității argininesteropeptidazice a subunității γ pe substratul TAME. Rezultatele sînt exprimate grafic în figura 3. Analizînd cele patru curbe de activitate, constatăm următoarele :

Curba corespunzătoare γ-NGF este situată deasupra tuturor celorlalte curbe, indicînd activitatea enzimatică maximă, în complexul 7S

NGF. Activitatea γ-enzimei nu poate fi total evidențiată, motiv pentru care curba activității 7S NGF se află sub cea a subunității libere. Totuși, enzima nu este complet inhibată datorită probabil existenței unei anumite proporții de subunități γ libere. Într-adevăr, reacția având loc într-un

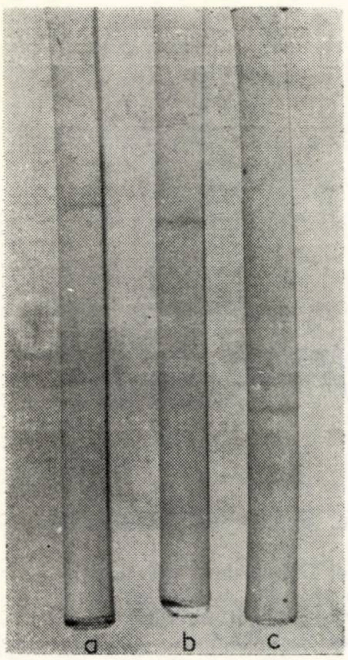


Fig. 2. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă, tampon TRIS-glicocol, pH 8,3.
a) NGF ; b) γ ; c) α.

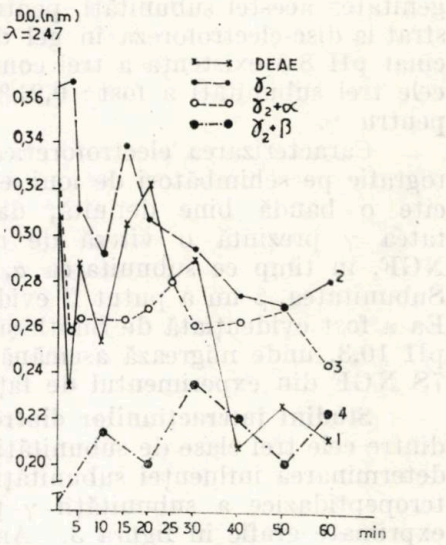


Fig. 3. — Variația activității arginin-esteropeptidazice a subunităților NGF în timp. Pe abscisă : diferența de extincție la 247 nm între probă și martor. 1 = 7S NGF ; 2 = γ ; 3 = γ + α ; 4 = = γ + β.

mediu de pH 7,4, complexul este supus unei disocieri simetrice în specii de tipul α $\beta_{1/2}\gamma$, cu greutate moleculară egală cu jumătate din cea a 7S NGF. Palmer și Neet (5) au sugerat că cele două subunități γ din mole-

cula oligomerului 7S prezintă o accesibilitate diferită la substratul TAME. Oligomerul fiind la pH 7,4 în echilibru cu jumătatea sa disociată, posibilitatea ca una din cele două subunități γ să-și manifeste activitatea enzimatică este crescută.

Amestecul în cantități egale în greutate de subunități γ și α manifestă o activitate enzimatică mai mică decît a γ-enzimei libere, dar mai crescută decît a complexului NGF (fig. 3). Subunitatea α a produs deci o slabă inhibare a activității enzimatice, mai slabă decît atunci cînd este prezentă și cea de-a treia subunitate, cum se întîmplă la 7S NGF. Datele bazate pe analiza de sedimentare, relatate de Palmer și Neet (4), confirmă aceste rezultate, demonstrînd că subunitățile α nu pot interacționa direct cu γ. Autorii menționați nu au găsit complexe formate din amestecul celor două tipuri de subunități în nici una din condițiile încercate. Subunitățile individuale sedimentează între 2,5 și 3 S. Existența γ-enzimei libere în amestecul cu α explică activitatea mare, apropiată de cea în absența subunității α. Totuși, o anumită interacțiune între α și γ a existat, rezultatul fiind blocarea parțială a enzimei. Se presupune că între α și γ pot exista interacțiuni numai atunci cînd între ele se creează o apropiere prin asocierea acestora la unitatea β (10). Această explicație are un precedent în studiul interacțiunilor din tetramerul hemoglobinei. Structura cristalină a complexului de hemoglobină $\alpha_2\beta_2$ prezintă cîteva legături polare între subunitățile identice. Acestea includ atît legături ionice, cît și de hidrogen. Contactele dintre lanțurile diferite sînt în cea mai mare parte nepolare. În soluție se întîlnește disocierea simetrică a complexului în dimeri $\alpha\beta$ și nu disocierea asimetrică în dimeri α_2 și β_2. O situație asemănătoare poate exista și în complexul NGF. Subunitățile α și γ pot avea cîteva contacte polare, care stabilizează complexul 7S NGF, dar care nu sînt suficiente pentru a ține legate subunitățile într-o soluție tamponantă, în absența dimerului β-NGF.

Curba activității enzimatice a γ-NGF în prezența subunității β a demonstrat o inhibare puternică a enzimei (fig. 3), sugerînd blocarea centrilor activi ai γ-esteropeptidazei în cadrul dimerului $\beta\gamma_2$. Rezultatele experiențelor de reasociere a subunităților (4) au arătat că între β și γ se pot forma combinații cu viteza de sedimentare 4,5S.

Complexul $\beta\gamma_2$, aproape total disociat la pH slab acid, prezintă cea mai mare stabilitate la un pH slab alcalin (10). În condițiile noastre de lucru, la pH 7,4 dimerul format pare relativ stabil, activitatea enzimei libere fiind foarte puțin exprimată. Experiențele de disociere a complexului 7S NGF în prezența EDTA și a NaCl au sugerat existența unor interacțiuni de natură ionică între β și γ (5), interacțiuni ce nu mai au loc în absența restului arginină C-terminal din lanțul polipeptidic al subunității β. S-ar putea ca interacțiunile $\beta-\gamma$ să fie cele mai importante pentru molecula NGF, cele două subunități conținînd activitatea biologică și, respectiv, activitatea enzimatică, una fiind un dimer polipeptidic (un substrat virtual), cealaltă o esteropeptidază.

O altă caracteristică a curbelor de activitate ilustrate în figura 3 este prezența mai multor maxime. Numai curba corespunzătoare subunității libere sau în combinație cu α (unde γ este practic tot liberă din considerentele prezentate anterior) are un singur maxim. Aceasta s-ar

putea datora asocierii și desfacerii complexelor în cursul reacției enzimatice cu participarea parțială a cantității de γ din amestec. Pentru 7S NGF însă, într-o lucrare anterioară (11) s-a evidențiat o creștere liniară a activității enzimatice în timp. În lucrarea menționată, cantitatea de NGF a fost de 4 μg, în timp ce în lucrarea de față s-au folosit 30 μg și se cunoaște efectul diluării, de a crește activitatea enzimatică a 7S NGF prin eliberarea γ-enzimei din complex.

Distribuția maximelor de activitate diferă de asemenea de la o curbă la alta. Astfel, curba corespunzătoare γ-enzimei prezintă maximum de activitate la 15 min de incubare, cea a NGF la 20 min, γ + α la 25 min și γ + β la 30 min. Aceste diferențe oglindesc modul în care γ-enzima liberă intră în reacție.

Demonstrarea unei activități mai mari a γ-enzimei în prezența subunităților α și β decît în prezența numai a uneia din ele se poate datora unor interacțiuni de tip proteină-proteină, stabilite în complexul NGF pe de o parte între α—β, pe de altă parte între α-γ și β-γ, care să aibă ca rezultat evidențierea centrului activ al enzimei.

Asupra interacțiunii α-β nu am discutat în această lucrare, deoarece ambele subunități nu posedă activitatea enzimatică. Totuși, dimerul $\alpha_2\beta$ a fost evidențiat atît în cursul disocierii complexului 7S NGF, cît și în experimentele de reasociere a subunităților, sub forma unui intermediar stabil cu viteza de sedimentare 4,7S (4). Complexarea Zn^{2+} din 7S NGF cu EDTA, ca și prezența NaCl 1 N, favorizează apariția unor astfel de intermediari. Importanța interacțiunii α-β a fost relatată într-o lucrare recentă (12), care arată că adăugarea subunității α-NGF la β-NGF marcată cu iod radioactiv modulează interacțiunea cu neuronii disociați

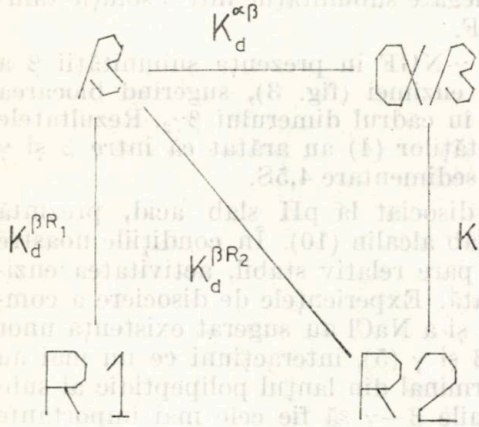


Fig. 4. — Model pentru legarea β-NGF în complexul α — β de receptorii cu afinitate înaltă (R_1) și cu afinitate mică (R_2) ai neuronilor senzitivi din ganglionii dorsali.

din rădăcinile dorsale. Pentru explicarea rezultatelor obținute, autorii au imaginat modelul din figura 4.

R_1 și R_2 sînt două locuri diferite de legare a β-NGF de celulele-țintă, cu afinitate mare și, respectiv, scăzută. După cum se vede, β-NGF se poate lega la fiecare din locuri. Linia ce leagă β de αβ indică echilibrul acestor forme în soluție. Rezultatele au sugerat că, așa cum

indică săgeata spre R_2, complexul α-β se poate lega de locul cu afinitate scăzută, nu și de cel cu afinitate mare, R_1. Așadar, adăugarea subunității α-NGF a dus la formarea complexului α-β cu proprietăți de legare diferite pentru cele două tipuri de receptori neuronali. Astfel de rezultate vor putea contribui la elucidarea funcției tipului II de receptori.

Ca o concluzie a datelor prezentate, considerăm semnificativă inhibarea diferențiată a enzimei prin agregarea cu celelalte două subunități sau numai cu una din ele. Complexul maschează subunitatea γ nu numai față de substrat, ci și față de eventualii inhibitori. De asemenea, subunitatea β, care în complexul 7S NGF prezintă o activitate biologică mai mare decît în stare liberă, preparată ca atare din glandele submaxilare de șoarece sau din alte surse, demonstrează efectul protector al celorlalte două subunități din complex. Rezultatele subliniază, așadar, complexitatea interacțiunilor dintre subunitățile componente ale 7S NGF, interacțiunile de tipul proteină-proteină avînd o importanță deosebită în evidențierea activității enzimatice, și arată existența unei legături funcționale între cele trei tipuri de subunități ale 7S·NGF, pe lîngă legăturile fizice.

Mulțumim în mod deosebit colegei noastre biolog Elisabeta Mihăilescu pentru ajutorul competent acordat în obținerea materialului biologic.

Prezentat la redacție
la 6 decembrie 1983

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS BETWEEN 7S NGF SUBUNITS

SUMMARY

α, β and γ subunits of nervous growth factor (7S NGF) were separated and purified by CM-cellulose chromatography from NGF isolated and purified from the mouse submaxillary glands. The interactions between the three classes of subunits were investigated by the determination of arginin esteropeptidase activity of γ subunit in the presence of α, β and $\alpha + \beta$. The results showed the decrease of the enzymatic activity of γ subunit, the presence of α and β respectively, as well as in the 7S NGF complex, in 0.05 M TRIS-HCl pH 7.4. The higher activity of the γ-enzyme in the presence of both α and β subunits than in the presence of only α or β, respectively, suggests the existence of protein-protein interactions between α and β or $\alpha-\gamma$ and $\beta-\gamma$, which might be very important for the unraveling of the enzyme active center.

BIBLIOGRAFIE

1. ELENA GANEA, S. A. HULEA, CECILIA MOTAȘ, Rev. roum. Biochim., **19**, 127 (1982).
2. ELENA GANEA, MARIA ANDRAȘ, St. cerc. biochim., **25**, 14 (1982).
3. ELENA GANEA, MARIA ANDRAȘ, St. cerc. biochim., **26**, 108 (1983).

4. T. E. PALMER, K. E. NEET, Arch. Biochem. Biophys., **205**, 412 (1980).
5. T. E. PALMER, K. E. NEET, J. biol. Chem., **255**, 5170 (1980).
6. S. VARON, J. NOMURA, E. E. SHOOTER, Biochemistry, **6**, 2202 (1967).
7. A. P. SMITH, S. VARON, E. E. SHOOTER, Biochemistry, **7**, 3259 (1968).
8. B. J. DAVIS, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
9. N. YOUNG, Biochemistry, **18**, 3030 (1979).
10. R. E. SILVERMAN, F. [illegible] BRADSHAW, J. Neurosci. Res., **8**, 127 (1982).
11. E. GANEA, E. MIHĂILESCU, R. BÎRNESCU, P. PRUNESCU, C. PRUNESCU, St. cerc. biochim., **26**, 31 (1983).
12. N. R. WOODROFF, K. E. NEET, J. Cell. Biochim., **19**, 231 (1982).

PARAMETRI ENZIMATICI AI CELULELOR HEPATICE PROVENITE DE LA ŞOARECI PURTĂTORI DE CARCINOM LEWIS

CORNELIA MIHAI

Rezumat. Unul din efectele prezenţei tumorii într-un organism îl constituie alterarea funcţiei unor organe vitale, cum ar fi ficatul. Pentru studierea acestui efect s-au folosit şoareci C57B1/6 grefaţi cu tumora metastazantă Lewis. În acest scop s-au dozat următoarele enzime ale celulelor hepatice : fosfataza alcalină şi acidă, lacticodehidrogenaza şi adenozindezaminaza ; de asemenea, s-a determinat adenozindezaminaza sanguină.

Experimentele efectuate arată o creştere a activităţii fosfatazelor alcalină şi acidă şi a lacticodehidrogenazei celulelor hepatice provenite de la purtătorul de tumoră, precum şi o scădere a adenozindezaminazei celulelor hepatice şi a celei sanguine.

Rezultatele sînt discutate în legătură cu prezenţa tumorii metastazante Lewis şi cu deficienţa imună a organismului purtător de tumoră.

Date anterioare au scos în evidenţă existenţa mai multor modificări biochimice în organismul purtătorului de tumoră ; astfel, se cunosc modificări enzimatice datorate disfuncţiei ficatului la om, ca şi modificări ale unor enzime serice datorate prezenţei neoplaziei (1).

În lucrări anterioare am arătat că mitocondriile provenite din ficatul şobolanilor purtători de ascită suferă alterări ale cuplării mecanochimice, precum şi unele alterări ale activităţii enzimatice a lanţului transportor de electroni (2), (3), (4). Aceste modificări sînt ireversibile şi se accentuează odată cu evoluţia tumorii.

Aceste lucrări au fost efectuate cu o tumoră nemetastazantă, şi anume ascita Guérin T8. Dar, pentru a apropia rezultatele experimentale de patologia umană, este necesar să se studieze modificările induse de neoplazie la animale purtătoare de tumoră metastazantă.

În lucrare s-a ales un model de tumoră de şoarece cu aspectul progresiei similar cu cel al neoplasmelor umane, şi anume carcinomul de plămîn Lewis (3LL). Carcinomul Lewis de şoarece apare spontan în 1951 ca un carcinom de plămîn într-un şoarece C57Black. El creşte rapid şi atinge o dimensiune de aproximativ $15 \times 10 \times 10$ mm la două săptămîni după transplantarea subcutană la şoarece. Este malign şi produce în mod regulat metastaze multiple ale plămînului.

Dată fiind similitudinea lui cu neoplasmele umane, acest carcinom de şoarece a fost cercetat din punctul de vedere al cineticii proliferării celulare (5), al sensibilităţii la citostatice (6), al legării imunoglobulinelor antitumorale şi a conjugatelor cu daunomicină (7), al antigenelor de membrană (8), (9).

În lucrarea prezentă s-au determinat activităţile următoarelor enzime ale celulelor hepatice : fosfatazele alcalină şi acidă, lacticodehidrogenaza şi adenozindezaminaza, ca şi adenozindezaminaza din sîngele total, cu scopul de a evidenţia anumite modificări biochimice datorate prezenţei tumorii în organismul purtătorului.

MATERIAL ŞI METODĂ

Animale. S-au utilizat şoareci C57B1/6 de 20—24 g ; tumora Lewis a fost transplantată subcutan, 10^5 celule/animal. Animalele au fost sacrificate la 1, 3, 7, 14, 21 şi 28 de zile de la grefare. Ficatul a fost extras pentru separarea de celule, iar sîngele a fost recoltat pe citrat de sodiu 3,8% prin puncţie cardiacă.

Celulele hepatice au fost separate prin metoda Fuhrmann (10). În prealabil, ficatul a fost spălat cu NH_4Cl 0,85% pentru purificarea de eritrocite, conform metodei Boyle (11). În final, celulele au fost suspendate în soluţie Krebs-Ringer, pH 7,4.

Enzime. Activitatea fosfatazei alcaline (ortofosforic monoester fosfohidrolaza, EC 3.1.3.1) s-a determinat după Saijo şi colab. (12), folosind disodium p-nitrofenilfosfat (Merck) în tampon glicină-NaOH 0,1 M, pH 10,5.

Fosfataza acidă (ortofosforic monoester fosfohidrolaza, EC 3.1.3.2) s-a dozat prin aceeaşi metodă, dar la pH 5. Activitatea acestor enzime s-a exprimat ca μg de p-nitrofenol format de 1 mg proteină într-un minut.

Lacticodehidrogenaza (hidroxibutiric dehidrogenaza, EC 1.1.1.27) s-a dozat, după Elliot şi Wilkinson (13), în tampon fosfat de sodiu 0,067 M, pH 7,4, folosindu-se ca substrat piruvatul de sodiu. Activitatea se exprimă ca unităţi spectrofotometrice per mg proteină/min.

Activitatea adenozindezaminazei (EC 3.5.4.4) s-a dozat prin metoda Goldberg (14) şi s-a exprimat în nmoli adenozină descompuşi de 1 mg proteină într-un minut la 37°C.

Proteina s-a dozat prin metoda Lowry şi colab. (15).

Preparatele provenite de la şoareci normali şi purtători de tumoră au fost lucrate simultan. Rezultatele sînt media a minimum cinci preparate celulare ; toate probele s-au lucrat în dublu.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Fosfataza alcalină. Activitatea fosfatazei alcaline creşte uşor la animalele normale odată cu maturarea lor ; spre deosebire de acestea, animalele purtătoare de tumoră Lewis demonstrează o creştere accentuată a acestei enzime odată cu creşterea tumorii. Diferenţele sînt mai pregnante din a 14-a zi, cînd tumora începe să metastazeze.

Relaţia dintre fosfataza alcalină şi tumori a fost mult studiată (16) şi s-a constatat că în majoritatea tumorilor are loc o creştere a activităţii enzimei ; activarea enzimei a fost pusă în evidenţă şi în ţesuturile gazdei, în special în ficat şi rinichi (17).

Fosfataza acidă. Similar fosfatazei alcaline, şi cea acidă creşte uşor odată cu maturarea şoarecilor. Dar această creştere este mai accentuată în celulele hepatice provenite de la şoareci purtători de tumoră, fiind mai evidentă, la fel, din ziua a 14-a, cînd începe metastazarea celulelor maligne.

Fosfataza acidă este o enzimă marker pentru lizozomi ; s-a arătat (18) că aceste particule subcelulare joacă un rol important în apărarea organismului de celulele maligne cu antigenicitate redusă.

Lacticodehidrogenaza. Dozarea acestei enzime în celulele hepatice arată o creştere uşoară datorită vîrstei şoarecilor normali. Dar această

creştere este mult accentuată la animalele purtătoare de tumoră Lewis, mai ales din ziua a 14-a, ajungînd să se dubleze din ziua a 21-a.

Această enzimă glicolitică poate caracteriza trecerea de la normal la canceros, cunoscută fiind glicoliza aerobă mai crescută în tumori în

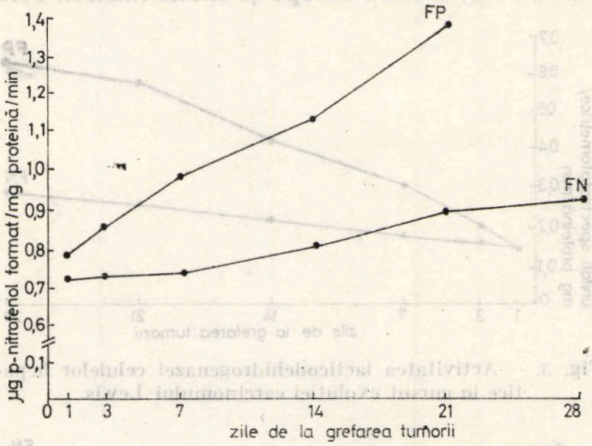


Fig. 1. — Activitatea fosfatazei alcaline a celulelor hepatice în cursul evoluţiei carcinomului Lewis.
FN — ficat de şoarece normal
FP — ficat de şoarece purtător de carcinom Lewis

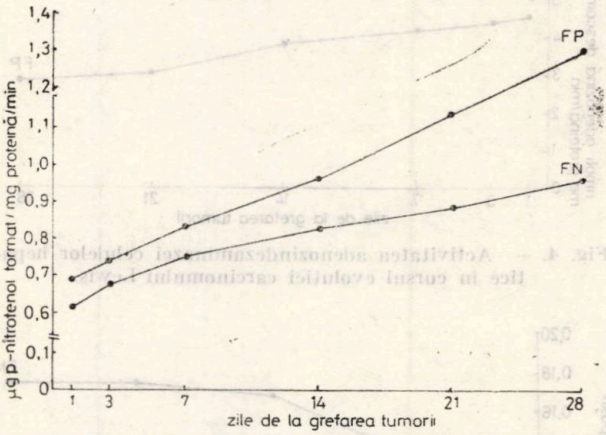


Fig. 2. — Activitatea fosfatazei acide a celulelor hepatice în cursul evoluţiei carcinomului Lewis.

defavoarea respiraţiei. Fără a fi purtător de metastaze, ficatul demonstrează o creştere a activităţii lacticodehidrogenazei, ceea ce reflectă o alterare a reacţiilor biochimice, care poate duce la o disfuncţie a ficatului datorată prezenţei tumorii, aşa cum s-a mai arătat (1), (2), (3), (4).

Adenozindezaminaza. Activitatea adenozindezaminazei celulelor hepatice creşte uşor odată cu maturarea şoarecilor; spre deosebire de aceştia, şoarecii purtători de tumoră manifestă chiar de la grefare o inhibare a acestei enzime, inhibare ce se accentuează drastic odată cu creşterea tumorii şi apariţia metastazelor.

Aceeași enzimă, dozată pe sîngele total provenit de la șoareci, demonstrează o creștere accentuată odată cu maturarea animalelor normale; activitatea enzimatică din sîngele șoarecilor purtători de tumoră crește ușor pînă în a 7-a zi, rămînînd totuși mai mică decît normalul, și scade începînd din ziua a 14-a, zi cînd începe și metastazarea celulelor maligne.

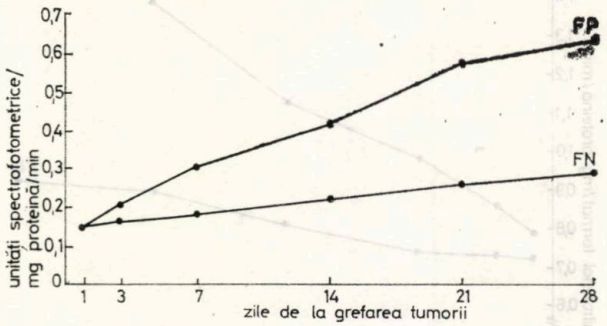


Fig. 3. — Activitatea lacticodehidrogenazei celulelor hepatice în cursul evoluției carcinomului Lewis.

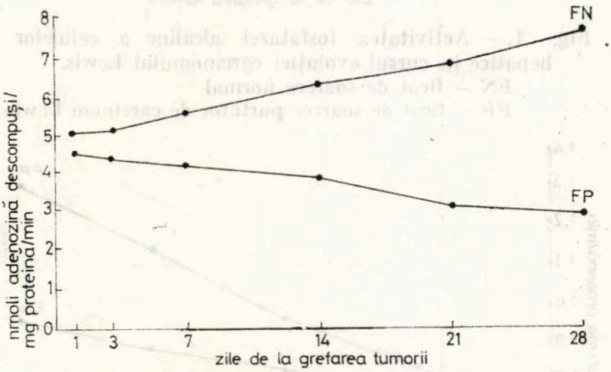


Fig. 4. — Activitatea adenozindezaminazei celulelor hepatice în cursul evoluției carcinomului Lewis.

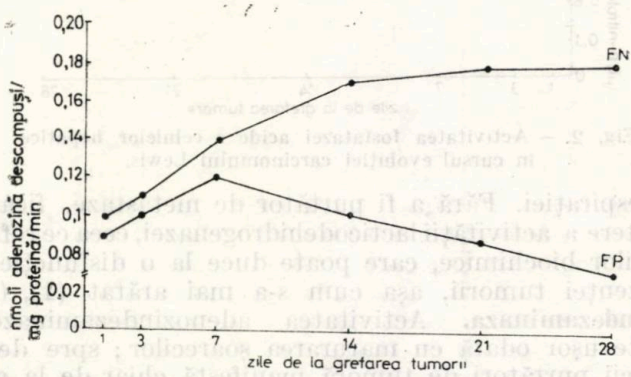


Fig. 5. — Activitatea adenozindezaminazei sanguine în cursul evoluției carcinomului Lewis.

Adenozindezaminaza catalizează reacţia adenozină → inozină $+NH_3$. Această enzimă a fost luată în studiu datorită faptului că o serie de lucrări recente (19), (20), (21) au pus în evidenţă o scădere accentuată a activităţii enzimei la bolnavii cu sindrom de deficienţă imună. Acelaşi lucru a fost observat la pacienţii care nu prezintă imunitate mediată celular sau umoral. Activitatea enzimei este scăzută în sîngele pacienţilor cu cancer (22), (23), ca şi în limfocitele de splină şi timus de la şobolani purtători de tumoră (24).

CONCLUZII

Investigarea biochimică a organismului canceros este deosebit de importantă pentru precizarea diagnosticului şi urmărirea tratamentului. Luarea în cercetare a acelor tumori experimentale care, prin progresia lor, pot fi asimilate tumorilor umane poate furniza date suplimentare folositoare diagnosticului şi urmăririi tratamentului. Dozarea unor enzime în celulele hepatice provenite de la şoareci purtători de carcinom Lewis a evidenţiat alterări ale funcţionalităţii ficatului, datorate prezenţei tumorii. De asemenea, adenozindezaminaza sanguină demonstrează o scădere a reactivităţii imune a animalelor purtătoare de tumoră metastazantă.

Prezentat la redacţie
la 2 septembrie 1982

Institutul oncologic Bucureşti,
Laboratorul de biochimia cancerului

ENZYMIC PARAMETERS OF HEPATIC CELLS FROM LEWIS CARCINOMA HOST MICE

SUMMARY

One of the tumor effects on an organism is the degradation of the function of some vital organs, e. g. of the liver. To study this effect, C57 B1/6 mice grafted with the Lewis metastasizing tumor were used. For this purpose the following enzymes of the hepatic cells were assessed : alkaline and acid phosphatases, lactatedehydrogenase and adenosinedeaminase ; sanguine adenosinedeaminase was also determined.

The performed experiments have shown an increase of alkaline and acid phosphatases as well as of lactatedehydrogenase of the hepatic cells from the tumor host mice and a decrease of the hepatic cells adenosindeaminase as well as of the sanguine one. The results are discussed in connection with the presence of Lewis metastasizing tumor and also with the immunodeficiency of tumor bearing organisms.

BIBLIOGRAFIE

1. J. P. GREENSTEIN, *Biochemistry of cancer*, Academic Press, New York, 1954, p. 507.
2. C. MIHAI, G. DINESCU, A. POPESCU, Rev. roum. Biochim., **10**, 191 (1973).
3. C. MIHAI, G. DINESCU-ROMALO, Rev. roum. Biochim., **15**, 219 (1978).
4. C. MIHAI, G. DINESCU-ROMALO, Rev. roum. Biochim., **16**, 49 (1979).

5. G. BADARACCO, C. GRECO, G. STARACE, Tumori, **66**, 669 (1980).
6. C. TROPE, Neoplasma, **22**, 171 (1975).
7. E. HURWITZ, B. SCHECHTER, R. ARNON, M. SELA, Int. J. Cancer, **24**, 461 (1979).
8. R. W. VELTRI, J. R. McKOLANIS, S. D. ROCKOFF, K. R. McINTIRE, Int. J. Cancer, **25**, 141 (1980).
9. M. FOGEL, E. GORELIK, S. SEGAL, M. FELDMAN, J. natl. Cancer Inst., **62**, 585 (1979).
10. F. FUHRMANN, in *Cell electrophoresis*, sub red. E. J. AMBROSE, J. & A. Churchill Ltd., London, 1965, p. 92.
11. W. BOYLE, Transplantation, **6**, 761 (1968).
12. N. SAIJO, H. NIITANI, T. TANIGUCHI, I. KAWASE, K. KIMURA, Gann, **66**, 253 (1975).
13. B. A. ELLIOT, J. H. WILKINSON, Lancet, **7**, 698 (1961).
14. D. GOLDBERG, Brit. med. J., **1**, 353 (1965).
15. O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, L. A. FARR, R. J. RANDALL, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
16. S. KARASAKI, Cancer Res., **35**, 482 (1975).
17. Y. KOJIMA, T. SAKURADA, Cancer Res., **36**, 23 (1976).
18. O. CAVARIC, V. SVERKO, M. BORANIC, Eur. J. Cancer, **9**, 549 (1973).
19. J. ZIMMER, A. S. KHALIFA, J. J. LIGHTBODY, Cancer Res., **35**, 68 (1975).
20. H. GREEN, T. CHANG, Science, **182**, 82 (1973).
21. G. WOLBERG, T. ZIMMERMANN, K. HIERNSTRA, M. WINSTON, CHU LI-CHIANG, Science, **187**, 957 (1975),
22. J. UBERTI, R. M. JOHNSON, R. TALLEY, J. J. LIGHTBODY, Cancer Res., **36**, 2046 (1976).
23. G. DINESCU-ROMALO, C. MIHAI, L. VLAD, Rev. roum. Biochim., **14**, 161 (1977).
24. G. DINESCU-ROMALO, C. MIHAI, I. KIŢULESCU, Rev. roum. Biochim., **15**, 23 (1978).

CERCETĂRI BIOCHIMICE ASUPRA CAROTENOIDELOR DIN PORUMB. II. CONȚINUTUL PIGMENȚILOR CAROTENOIDICI DIN PORUMB DIPLOID NORMAL ȘI OPAQUE-2 ȘI DIN PORUMB DIHAPLOID

G. NEAMȚU, I. CĂBULEA*, C. BOTEZ**, GH. ILLYES, FL. IRIMIE

Rezumat. S-au cercetat pigmenții carotenoidici din 10 hibrizi de porumb diploid normal, 10 hibrizi opaque-2, precum și din 12 linii și 12 hibrizi dihaploizi, pentru a se obține date cu privire la determinismul genetic al biosintezei carotenoidelor, în vederea realizării unor forme noi de porumb, cu conținut ridicat de carotenoide provitaminice.

Din cercetările efectuate reiese că porumbul normal diploid are un conținut total de carotenoide mai ridicat decît porumbul diploid opaque-2. Pigmentul principal din boabele de porumb normal îl constituie zeaxantina, care împreună cu criptoxantina și carotenoidele hidrocarburice imprimă boabelor de porumb o culoare portocalie-roșiatică. Porumbul opaque-2 are un conținut mai ridicat de luteină și epoxizi, pigmenți ce imprimă boabelor o culoare galbenă-portocalie.

Sub aspectul carotenoidelor provitaminice, porumbul opaque-2 are un conținut ceva mai mic decît porumbul normal, deosebirile dintre hibrizi fiind mici, în majoritatea cazurilor sub 1 μg/g.

Liniile dihaploide au un conținut total de carotenoide mai mare decît materialul inițial de la care au derivat, ca o consecință a mecanismului de derivare. Hibrizii simpli obținuți prin încrucișarea dialelă dintre patru linii dihaploide de porumb au de asemenea un conținut total de carotenoide și pe diferite fracțiuni cu mult mai mare decît formele parentale, datorită efectului de heterozis și efectelor genetice aditive și de interacțiune cu supradominanță.

În continuarea cercetărilor noastre privind determinarea pigmenților carotenoidici din porumb (1), (2), cu scopul de a obține date referitoare la determinismul genetic al biosintezei carotenoidelor, în această lucrare prezentăm pigmenții carotenoidici din 10 hibrizi de porumb diploid normal și 10 hibrizi diploizi opaque-2, precum și din 12 linii și 12 hibrizi dihaploizi, care reprezintă un material biologic pur din punct de vedere genetic, perfect homozigot.

Pentru obținerea unor forme noi de porumb cu conținut ridicat de carotenoide provitaminice, o importanță deosebită au hibrizii de porumb opaque-2, care prezintă un conținut mai ridicat de aminoacizi esențiali decît hibrizii normali (3), (4), (5), precum și hibrizii dihaploizi, care se obțin într-un timp mai scurt decît hibrizii diploizi.

Prin obținerea unor forme noi de porumb cu conținut ridicat de carotenoide provitaminice, se va putea realiza o valorificare superioară a boabelor de porumb, atît în hrana omului cît și în furajarea animalelor. Se știe că pigmenții carotenoidici sînt componenți importanți ai porumbului, care determină culoarea boabelor, iar β-carotenul constituie principala sursă de vitamină A pentru om și animale. Carotenoidele influ-

enţează pozitiv creşterea organismelor, determină formarea pigmenţilor fotosensibili implicaţi în procesul vederii, protejează numeroase substanţe biologic active de degradări oxidative, reduc sterilitatea la animale etc.

Efectuarea acestor cercetări se impune cu atît mai mult cu cît porumbul este o plantă principală de cultură, care are un rol însemnat în alimentaţia oamenilor şi în furajarea animalelor, constituind totodată o materie primă de bază pentru industria alimentară.

MATERIAL ŞI METODE

Hibrizii de porumb diploid normal şi cei opaque-2 s-au procurat de la S.C.A. Turda, fiind obţinuţi de un colectiv de cercetători condus de dr. ing. I. Căbulea. Liniile şi hibrizii dihaploizi s-au procurat de la disciplina de genetică şi ameliorare a Institutului agronomic din Cluj-Napoca.

Numerotarea hibrizilor obţinuţi la S.C.A. Turda este diferită de cea obţinută în cîmpul experimental.

Extragerea carotenoidelor s-a făcut din făină proaspăt obţinută şi umectată cu apă, cu un amestec de acetonă-eter de petrol-metanol, în raport de 6 : 3 : 1, pînă ce extractul a rămas incolor. Urmează apoi spălarea extractului primar cu apă de 15—20 de ori, pentru îndepărtarea acetonei şi a metanolului. Extractul în eter de petrol spălat se trece peste un strat de Na_2SO_4 anhidru, pentru reţinerea urmelor de apă.

Pentru separarea şi purificarea carotenoidelor s-a folosit cromatografia pe coloană, utilizîndu-se ca adsorbant amestec de oxid de magneziu şi nisip fin, în raport de 2 : 1 în greutate. Developarea coloanelor s-a făcut cu amestec de eter de petrol şi acetonă, în concentraţie crescîndă pînă la 20%, în funcţie de tasarea materialului adsorbant. Pentru purificarea pigmenţilor şi pentru cromatograme de amestec s-a folosit şi cromatografia în strat subţire, utilizîndu-se ca adsorbant oxid de magneziu, silicagel şi gips deshidratat, în raport de 1 · 1 : 0,5, iar ca developant amestec de eter de petrol—acetonă—metanol, în raport de 20 : 3 : 1.

Identificarea şi determinarea carotenoidelor s-au făcut prin metode cromatografice şi spectroscopice, utilizate curent în cercetarea carotenoidelor (1), (2), (6), (7), (8).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conţinutul pigmenţilor carotenoidici din hibrizii de porumb diploid normal şi hibrizii de porumb diploid opaque-2, obţinuţi din acelaşi genotip în urma segregării caracterelor, se prezintă în tabela 1.

Din cercetările efectuate reiese că hibrizii de porumb diploid normal au un conţinut total de carotenoide mai ridicat decît hibrizii de porumb diploid opaque-2, fapt ce indică existenţa unor diferenţieri genetice între aceste două categorii de hibrizi.

Pigmentul principal din hibrizii de porumb normal îl constituie zeaxantina, care împreună cu criptoxantina şi cu carotenoidele hidrocarburice determină culoarea portocalie-roşiatică a boabelor de porumb. Conţinutul zeaxantinei este cu mult mai ridicat la porumbul normal decît la cel opaque-2.

Al doilea pigment ca importanţă, sub aspect cantitativ, îl constituie luteina, al cărei conţinut este mai mic decît al zeaxantinei în porumbul normal şi mai mare în porumbul opaque-2. Zeaxantina şi luteina sînt doi pigmenţi dihidroxilici, care în boabele de porumb se găsesc predominant sub formă de complexe carotenoproteice, fapt ce le asigură o mai mare stabilitate la acţiunea factorilor fizico-chimici externi.

Conţinutul criptoxantinei are valori apropiate la cele două categorii de hibrizi.

Tabela 1

Conținutul pigmenților carotenoidici din boabe de porumb diploid normal (**) și opaque-2 (0202), în μg/g material uscat

Hibrizi	Pigment	Epoxizi	Zeaxantină	Luteină	Criptoxantină	Carotenoide hidrocarburice	Total carotenoide provitaminice	Total carotenoide
1	**	2.01	8,91	6.74	2,52	2,86	5,38	23,04
	0202	2,60	5.48	7,78	2,24	2.65	4,89	20,75
2	**	2.65	9,30	6,02	2,20	2,01	4,21	22.18
	0202	3,86	5.60	6,93	2.21	1,96	4.17	20,56
3	**	2,88	16.02	10,40	2,39	4,20	6.59	35,89
	0202	3,64	9,96	14.04	2,68	3.56	6.24	22,88
4	**	3.02	18,34	10,31	2,52	2,69	5,31	36.88
	0202	5,54	10,56	12,54	2,92	2,33	6,25	33,89
5	**	2,74	8,80	6,27	3,12	4,43	7,46	25,27
	0202	3,16	5.45	9,36	2.01	2,43	4,44	22,41
6	**	1,91	20.92	8,96	3,57	4,53	8.10	39,89
	0202	3,86	8,61	14,32	3,64	3,52	5,16	33.95
7	**	2.87	17,66	10,88	2,14	3,51	5,65	37.06
	0202	4,68	8,86	12,96	2,09	3,21	5.30	31,80
8	**	2.65	17,49	12,20	2,21	2,38	4,57	36,91
	0202	3,20	9,64	14,64	1,81	2,47	4,28	33,76
9	**	2,47	16,13	11,17	1,96	2,05	4,01	33,78
	0202	3,76	8,99	12,04	1,69	1,67	3,36	28,15
10	**	3,28	14,03	8,53	2,44	2,40	4,84	30,68
	0202	4,52	7,76	11,06	2,49	2,69	4,18	28,52

La majoritatea hibrizilor de porumb normal, conținutul carotenoidelor hidrocarburice este mai mare decît la hibrizii opaque-2, cu excepția hibrizilor 8 și 10, unde raportul este invers.

Hibrizii cercetați au un conținut total de carotenoide provitaminice ridicat, fapt deosebit de important dacă se ține seama de aportul acestor carotenoide la creșterea și dezvoltarea organismelor animale, la îmbunătățirea valorii biologice a boabelor de porumb. Hibrizii de porumb normal, cu excepția hibridului 4, au un conținut de carotenoide provitaminice mai mare decît hibrizii opaque-2. Deosebirile sînt însă mici, în majoritatea

cazurilor sub 1 μg/g, cu excepția hibrizilor 5 și 6. Din aceste cercetări reiese că hibrizii opaque-2 sînt valoroși nu numai sub aspectul aminoacizilor esențiali, ci și sub aspectul carotenoidelor provitaminice. Se impune deci elaborarea unor metode de ameliorare genetică pentru a obține hibrizi opaque-2 cu producții mari, rezistenți la acțiunea factorilor externi, cu conținut ridicat în aminoacizi esențiali și în carotenoide provitaminice.

Sub aspectul carotenoidelor, porumbul opaque-2 se caracterizează printr-un conținut ridicat de luteină și epoxizi, pigmenți care determină culoarea galbenă-portocalie a boabelor. Conținutul acestor pigmenți este mai mare la toți hibrizii opaque-2 decît la hibrizii normali.

Sub aspectul conținutului carotenoidelor totale, cei mai valoroși sînt hibrizii normali 6, 7, 8, 4.

Hibrizii cei mai bogați în diferite tipuri de carotenoide de la ambele categorii de hibrizi se prezintă în tabela 2.

Tabela 2

Hibrizii cei mai bogați în diferite tipuri de carotenoide

Poziția	I		II		III		IV	
Tipul hibridului / Pigmenți	**	0202	**	0202	**	0202	**	0202
Epoxizi	10	4	4	7	8	10	7	9
Zeaxantină	6	4	4	3	7	8	8	9
Luteină	8	8	9	6	7	3	4	9
Criptoxantină	6	6	5	4	1	3	10	10
Carotenoide hidrocarburice	6	3	4	6	7	7	1	10
Total carotenoide provitaminice	6	4	5	7	3	6	7	1
Total carotenoide	6	6	7	4	4	3	3	8

Avînd în vedere conținutul ridicat în carotenoide al acestor hibrizi, îi recomandăm să fie utilizați în procesul de ameliorare pentru obținerea unor forme noi de porumb, cu conținut ridicat în diferite tipuri de carotenoide.

Conținutul pigmenților carotenoidici din liniile dihaploide și din materialul inițial hibrid, considerat ca martor, se prezintă în tabela 3.

Din cercetările efectuate reiese că, în general, liniile dihaploide au un conținut total de carotenoide și pe diferite fracțiuni mai mare decît materialul inițial de la care au derivat. Sporirea conținutului de carotenoide

în liniile dihaploide apare ca o consecință a mecanismului de derivare a liniilor dihaploide.

Între diferitele linii dihaploide există mari variații în ceea ce privește conținutul total atît de carotenoide, cît și al diferitelor tipuri de pigmenți.

Tabela 3

Conținutul în carotenoide (µg/g) la liniile dihaploide de porumb derivate de la un material inițial hibrid (Cluj-Napoca, 1982)

Linia	Originea	Carotenoide						Carotenoide totale
		hidrocarburice	criptoxantină	provitaminice	luteină	zeaxantină	epoxizi	
315/81/Z	T—41	1,57	2,01	3,58	7,26	11,38	1,57	23,79
Martor	—	0,93	1,28	2,21	5,04	5,44	1,43	14,14
L_1/1981	ETA	0,37	0,80	1,17	5,67	6,83	3,00	16,67
L_3/1981	ETA	1,43	2,00	3,43	4,96	12,63	1,63	22,88
Martor	—	0,45	1,36	1,81	8,28	5,02	1,64	16,75
L_2/1981	BRUTUȘI	1,21	1,60	2,81	5,45	10,45	2,04	20,77
Martor	—	0,04	1,52	1,56	4,50	6,86	1,80	14,72
L_6/1981	EWE	1,21	2,38	3,59	4,12	10,74	1,31	19,77
L_7/1981	EWE	1,21	0,82	2,03	6,35	17,41	2,65	28,44
Martor	—	0,93	1,28	2,21	5,04	5,44	1,43	14,12
L_4/1981	S 1/3	0,52	0,91	1,43	6,44	7,20	1,73	16,80
Martor	—	0,32	1,13	1,45	5,98	7,18	1,28	15,89

Acest fapt indică existența unor diferențieri genetice între linii în privința factorilor care determină biosinteza carotenoidelor, oferind în acest fel posibilitatea de a obține unele genotipuri, prin consangvinizare sau derivare de linii dihaploide, cu un conținut ridicat de carotenoide. Față de lucrarea anterioară (1), atît la liniile dihaploide, cît și la materialul inițial s-a observat o reducere a carotenoidelor totale, fapt ce ne permite să susținem că factorii implicați în determinismul genetic al carotenoidelor sînt supuși influenței condițiilor de mediu.

Dintre liniile cercetate în privința conținutului total de carotenoide, se remarcă linia L_7/1981, iar sub aspectul conținutului carotenoidelor provitaminice se evidențiază liniile 315/81/Z, L_3/1981 și L_6/1981. Sărace în carotenoide sînt liniile L_1/1981 și L_4/1981.

Conținutul pigmenților carotenoidici din hibrizii simpli obținuți prin încrucișarea dialelă între patru linii dihaploide de porumb, alături de media conținutului în carotenoide la formele parentale, se prezintă în tabela 4.

Din datele obținute reiese în mod cert că hibrizii simpli de porumb în F_1 au un conținut total de carotenoide și pe fracțiuni mult mai mare decît media formelor parentale. Se manifestă, fără îndoială, efecte de heterozis, care au determinat mărirea conținutului de carotenoide la hibrizi, manifestare la care contribuie, pe lîngă efectele genetice aditive, și efectele genetice de interacțiune cu supradominanță.

Tabela 4

Conținutul în carotenoide la hibrizii simpli obținuți prin încrucișarea dialelă dintre patru linii dihaploide de porumb, alături de media conținutului în carotenoide la formele parentale, în µg/g

Media formelor parentale ($\bar{x}$) și hibridul	Carotenoide hidrocarburice	Criptoxantină	Carotenoide provitaminice	Luteină	Zeaxantină	Epoxizi	Carotenoide totale
$\bar{x}$ — părinți	1,03	1,39	2,42	6,33	7,11	1,84	21,39
241 × 242	2,13	3,98	6,11	14,40	14,35	2,03	36,89
$\bar{x}$ — părinți	0,73	1,02	1,75	4,10	6,64	1,64	14,13
241 × 243	2,49	5,14	7,64	16,64	24,13	3,97	52,38
$\bar{x}$ — părinți	0,90	1,66	2,56	7,51	9,21	1,93	21,22
241 × 244	2,12	4,06	6,18	10,00	17,63	2,95	37,01
$\bar{x}$ — părinți	0,73	1,82	2,55	5,36	7,26	2,75	17,92
242 × 243	1,76	3,52	5,28	8,11	11,42	4,05	28,86
$\bar{x}$ — părinți	1,70	1,40	2,80	6,57	10,41	2,41	21,23
243 × 244	2,63	5,01	7,64	12,69	23,29	4,49	48,12
$\bar{x}$ — părinți	1,95	1,75	2,70	8,43	10,20	2,03	23,36
242 × 244	1,97	4,82	6,79	10,24	23,57	3,59	44,19

CONCLUZII

1. Cercetările efectuate asupra pigmenților carotenoidici din materialul biologic obținut la S.C.A. Turda au evidențiat existența unor hibrizi de porumb normal și opaque-2 valoroși, care pot fi folosiți cu succes în procesul de ameliorare, în vederea obținerii unor forme noi, cu conținut stabil ridicat atît în carotenoide provitaminice, cît și în carotenoide totale.

2. La toți hibrizii cercetați s-au identificat aceleași carotenoide, deosebirile dintre pigmenți fiind numai de ordin cantitativ.

3. Hibrizii de porumb normal se caracterizează printr-un conținut mediu mai ridicat de zeaxantină și de carotenoide provitaminice, fapt ce determină culoarea portocalie-roșiatică a boabelor de porumb, iar hibrizii opaque-2 au un conținut mediu mai mare de luteină și de epoxizi, fapt ce determină culoarea galbenă-portocalie a boabelor.

4. Liniile dihaploide derivate de la un material inițial hibrid se caracterizează printr-un conținut mai ridicat în carotenoide decît materialul de origine de la care au derivat.

5. Prin încrucișarea liniilor dihaploide se pot obține hibrizi simpli, la care se manifestă efectul de heterozis atît în privința conținutului în carotenoide totale, cît și pe diferite fracțiuni.

Prezentat la redacție
la 13 iunie 1983

Disciplina de biochimie vegetală,
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza",
Cluj-Napoca
* *Stațiunea de cercetări agricole Turda,*
jud. Cluj
** *Disciplina de genetică și ameliorare a plantelor,*
Institutul agronomic „Dr. Petru Groza",
Cluj-Napoca

BIOCHEMICAL RESEARCHES OF CAROTENOIDS IN MAIZE. II. CONTENT OF CAROTENOID PIGMENTS IN NORMAL DIPLOID MAIZE, IN OPAQUE-2 MAIZE AND IN DIHAPLOID MAIZE

SUMMARY

Investigations were carried out on the carotenoid pigments in ten hybrids of normal diploid maize, and in the opaque-2 hybrids and also in twelve lines and twelve dihaploid hybrids, as to obtain data concerning the genetic determinism of biosynthesis of carotenoids with the view to creating new forms of maize, possessing a high content of pro-vitamin carotenoids.

From these investigations it was inferred that the normal diploid maize has a total content of carotenoids higher than the diploid opaque-2 maize. The main pigment from normal maize grains is zeaxanthin, which together with cryptoxanthin and hydrocarbon carotenoids lend to maize grains an orange-reddish colour. The opaque-2 maize has a higher content of lutein and epoxides, which impress a yellow-orange colour to the grains.

From the viewpoint of pro-vitamin carotenoids, the opaque-2 maize has a somewhat lower content than the normal maize, the differences between hybrids being small, in most cases below 1 μg/g.

The dihaploid lines have a higher total content of carotenoids in comparison with the initial material from which they were derived, as a consequence of the derivation mechanism itself.

The simple hybrids obtained by the diallelic crossing between four dihaploid lines of maize possess a total content of carotenoids and — in some of their different fractions — far higher than the parental forms, owing to the heterosis effect as well as to the genetic effects which are both additive and of overdominance interaction.

BIBLIOGRAFIE

1. G. NEAMȚU, C. PANFIL, C. BOTEZ, GH. ILLYES, K. L. SIMPSON, St. cerc. biochim., **26**, 58 (1983).
2. G. NEAMȚU, GH. ILLYES, ECATERINA PESCARU, Buletin IACN-A, **36**, 55 (1982).
3. I. CĂBULEA, *Proceedings of the fifth meeting of the maize and sorghum of EUCARPIA*, sub red. I. KOVACS, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1971.
4. T. MUREȘAN, GH. ȘIPOȘ, FL. PAULIAN, I. MOGA, *Cultura porumbului*, București, 1973, p. 26.
5. C. O. GROGAN, C. W. BLESSIN, Crop Science, **8**, 730 (1968).
6. C. BODEA, GH. ILLYES, C. BILĂUȘ, I. CĂBULEA, Rev. roum. Biochim., **5**, 11 (1968).
7. B. H. DAVIES, *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, sub red. T. W. GOODWIN, ed. a 2-a, vol. II, 1976, p. 38.
8. S. LIAAEN-JENSEN, în *Carotenoids*, sub red. O. ISLER, Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart, 1971, p. 61.

MODIFICĂRI BIOCHIMICE PRODUSE ÎN URMA EFORTULUI MUSCULAR LA SPORTIVI

RADU OLINESCU, GH. IONIȚĂ, NORA PASCU, NICOLAE MOCANU

Rezumat. S-au determinat parametrii biochimici înainte și după efort muscular mediu de antrenament la trei loturi, în scopul găsirii unui test al intensității efortului depus. În timp ce pentru lactat, echilibrul acido-bazic și trigliceride nu s-au găsit modificări semnificative în sînge, la determinarea eliminării urinare de fosfați anorganici s-au observat diferențe semnificative. Exprimarea eliminării de fosfați prin raportul fosfați/creatinină permite micșorarea influenței diurezei și aprecierea efortului depus în cursul antrenamentului.

Modificările biochimice produse în cursul efortului muscular au constituit de mult un interesant obiect de studiu în scopul ameliorării randamentului și al evitării de accidente datorită efortului intensiv. Acidoza lactică, modificările echilibrului acido-bazic, deversarea unor enzime intracelulare în sînge, eliminarea renală a unor mucoproteine (tip Donaggio), variațiile glicogenolizei și glicolizei constituie ansamblul de schimbări metabolice ce se produc în urma unui efort intens (1), (2). Pe măsura acumulării de noi date biochimice s-a observat complexitatea acestor modificări, care sînt supuse influenței unor factori subiectivi, neurohormonali, sau unor variații largi individuale (3).

Modificările biochimice menționate se produc doar în cursul unui efort intens; cele ce apar după un travaliu moderat sînt puțin studiate, deși sînt foarte utile în aprecierea gradului de antrenament. Deoarece în final orice efort este dependent de energia înmagazinată în fosfații macroergici de tip ATP, în afara parametrilor biochimici cunoscuți și menționați, am urmărit eliminarea urinară de fosfați anorganici rezultați în urma reacției de hidroliză enzimatică a ATP (1), (2).

MATERIAL ȘI METODĂ

Determinările biochimice s-au efectuat înainte și după antrenamente în condiții standardizate specifice fiecărei discipline sportive. Au fost alcătuite trei loturi a cîte 10 sportivi de performanță. Lotul I a cuprins sportivi pentru lupte greco-romane, lotul II pentru volei și lotul III atleți de fond. Antrenamentele au fost de tip mixt, anaerob și aerob, cu intensitate de aproximativ 200 W, cu durată de 1 pînă la 3 ore pentru loturile II și III și de 10—15 minute pentru lotul I.

Recoltările de sînge și urină s-au efectuat înaintea antrenamentului, în timpul efortului maxim sau după antrenament (recoltările de urină).

Determinările biochimice s-au efectuat folosind următoarele kituri: Merckotest: fosfat anorganic art. 3331, trigliceride art. 3392, lipide totale art. 3321; Boehringer: lactat nr. 124842, ATP nr. 15979. Determinările de creatinină și de echilibru acido-bazic (aparat Astrup) s-au executat conform tehnicilor clasice (4).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Scopul determinărilor biochimice a fost în primul rînd testarea unor parametri biochimici ce ar putea constitui criterii de apreciere biologice în condițiile unui efort muscular moderat, care să aducă informații asupra consumului energetic, rezistenței și capacității de refacere.

După cum se poate observa din tabela 1, în cazul celor trei loturi, efortul a fost moderat, corespunzînd criteriilor de specialitate. Lipsa aci-

Tabelul 1

Modificări biochimice în sînge înainte și după efort fizic

Parametri	Lot I		Lot II		Lot III	
	înainte de efort	după efort	înainte de efort	după efort	înainte de efort	după efort
Lactat	13,8±4,2	15,6±3,2	14.6±3,1	15,2±2,8	12,8±1,2	16.4±4,1
pH	7,377	7,368	7.435	7,438	7,417	7,365
PCO_2(mm Hg)	52,8±3,5	49,4±2,6	50,3±3,2	48,2±5,3	51,2±3,6	46,3±4,8
HCO_3^-(mEq/l)	27,2±2,1	23,1±3,4	26.2±1,9	22,5±3,3	25,4±2,6	18,5±3,8
ATP	21,4±4.1	23.2±2.8	22,4±1.2	24,4±2,6	24,5±3,1	19,5±4,2
Lipide totale	896±22	912 ±34	783 ±26	836±15	694±18	884±24
Trigliceride	42.5±2,8	51,4±3,2	36.8±2.2	42,6±3,2	37,4±2,9	43,4±3,5

Notă. Lactatul, ATP, lipidele totale și trigliceridele sînt exprimate în mg %.
În tabelă sînt trecute mediile aritmetice eroarea standard ale rezultatelor obținute în urma determinărilor la loturile respective înainte și după efortul de antrenament. Din prelucrarea statistică nu au rezultat diferențe semnificative (testul „t" Student efectuat la calculator electronic cu programare).

dozei, indicată de nivelul acidului lactic sau de componentele echilibrului acido-bazic, constituie un criteriu absolut, marcînd un efort moderat corespunzător unor măsurători medicale (datorie de oxigen compensată, tensiune arterială 160/70 mm Hg), deși în toate cazurile au fost perioade cu efort de intensitate mare. De asemenea, nici variațiile componentelor lipidice (lipide totale, trigliceride) nu au indicat diferențe semnificative în concordanță cu ceilalți parametri studiați.

În continuare am urmărit la aceleași loturi de sportivi variațiile eliminării fosfaților anorganici, exprimate atît în mg/ml urină, cît și ca raport fosfat/creatinină, pentru a evita erorile datorate diurezei diferite. De aceea, urina s-a recoltat după același efort testat anterior.

Din tabela 2 se observă o creștere semnificativă la loturile I și III, prin ambele moduri de a exprima eliminarea fosfaților anorganici. Exprimarea prin raportul fosfat/creatinină pare mai avantajoasă decît cea prin mg/ml, deși în acest fel trebuie introdusă o determinare în plus (de creatinină). Lipsa unei diferențe semnificative la lotul II (jucători de volei), în comparație cu celelalte loturi, nu pare surprinzătoare datorită unui efort mai puțin intens.

Ca și la parametrii prezentați în tabela 1, eliminarea fosfaților anorganici este supusă unor largi variații individuale sau chiar la același sportiv în cursul unei perioade variabile de timp. În consecință, prezentăm, pentru o perioadă de opt zile, diferențele mediilor aritmetice ale

eliminării urinare de fosfaţi la lotul I. Datele prezentate în figura 1 oferă posibilitatea unor interpretări interesante din punct de vedere practic, legate de intensitatea efortului de antrenament : o scădere evidentă între

Tabela 2

Variaţia eliminării urinare a fosfaţilor anorganici înainte şi după efort, exprimată în fosfor anorganic (mg/ml) şi ca raport fosfat/creatinină

Lot	Fosfat		Fosfat/creatinină		Diferenţă statistică
	înainte de efort	după efort	înainte de efort	după efort	
Lot I	1,48±1,13	2,22±0,24*	19,0 ±2,05	24,8±2,68*	$p < 0,05$
Lot II	1,47±0,17	1,67±0,37	14,2 ±2.1	16,5±2.6	nesemnificativ
Lot III	1,31±0,19	1,84±0,31	15,09±2.4	20,3±3,6*	$p < 0,05$

Notă. În tabelă s-au trecut mediile aritmetice ± eroarea standard. Toate valorile s-au analizat statistic comparativ pe lot, înainte şi după efortul de antrenament (testul „t" Student). Rezultatele marcate cu * indică o diferenţă semnificativă pentru problematica menţionată.

zilele a 3-a şi a 6-a. În general, cu unele excepţii, cele două moduri de exprimare coincid. Doar în perioada amintită, cele două moduri de exprimare a determinării fosfaţilor nu coincid, datorită fie efortului în sine, fie dietei. Oricum, rezultatele diferite din perioada amintită indică o discontinuitate în efortul depus şi probabil şi în performanţele obţinute.

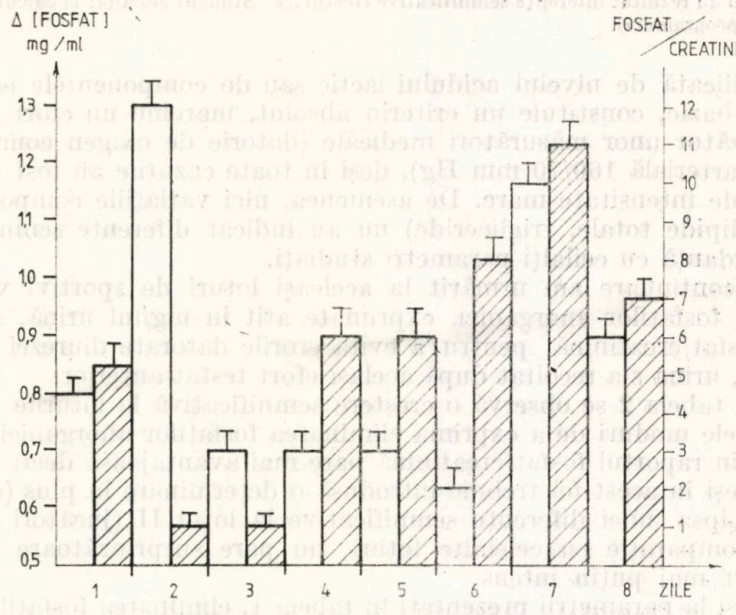


Fig. 1. — Eliminarea urinară de fosfaţi anorganici la lotul I de sportivi în cursul unei perioade de antrenament. Concentraţia de fosfaţi este exprimată în mg/ml (scara din stînga, nehaşurat) şi ca raport fosfat/creatinină (scara din dreapta, haşurat).

Deoarece mai ales în perioada menționată (zilele 3—6, fig. 1) eliminarea de fosfați este supusă unor mari diferențe individuale, în figura 2 prezentăm pentru același lot I diferențele în excreția de fosfat la trei sportivi în aceeași perioadă de timp ca în figura 1. Din figura 2 se observă că la cei trei sportivi eliminarea de fosfați, exprimată în mg/ml, variază mai mult decît cea ca raport fosfat/creatinină. Trebuie subliniată

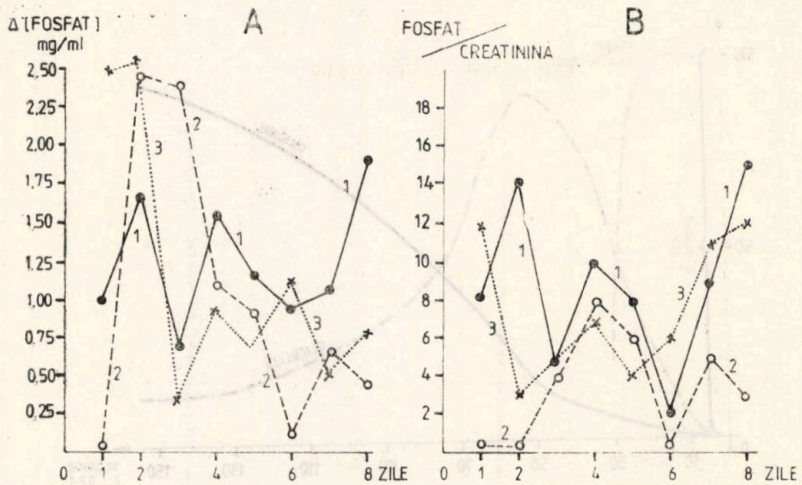


Fig. 2.— Eliminarea urinară de fosfați la trei sportivi din lotul I în aceeași perioadă de antrenament. Fiecare valoare reprezintă diferența dintre determinările efectuate înainte și după efort în ziua respectivă. Concentrația de fosfat este exprimată în mg/ml (A) sau ca raport fosfat/creatinină (B).

asemănarea în eliminarea fosfaților între sportivii 1 și 3 numai în cazul exprimării sub formă de raport fosfat/creatinină; la sportivul 2, raportul fosfat/creatinină a fost subunitar la începutul perioadei studiate, sugerînd o lipsă de formă fizică corespunzătoare.

În condițiile unui efort fizic moderat, lipsa unei diferențe semnificative la parametrii biochimici clasici, prezentați în tabela 1, este justificată. În schimb, la aceleași loturi, prelucrarea statistică a datelor a arătat diferențe semnificative (tabela 2) în eliminarea de fosfați anorganici. Valoarea acestei determinări crește prin urmărirea evoluției acestui parametru în cursul unei perioade de timp (fig. 1) și mai ales a fiecărui sportiv în parte (fig. 2).

Eliminarea fosfaților în urma unui efort fizic moderat sau intens rezultă din scindarea fosfaților macroergici, conform relației (1):

$$ATP + H_2O \xrightarrow{\text{miozin-ATPază}} ADP + \text{fosfat} \qquad (1)$$

în cursul căreia se eliberează aproximativ 12 000 de calorii (5). Fosfatul eliberat în cursul hidrolizei enzimatice a ATP (relația 1) este în mare parte eliminat pe cale renală, iar resinteza ATP, conform relației (2),

$$\text{creatinfosfat} + ADP \xrightarrow{\text{creatinkinază}} \text{creatină} + ATP \qquad (2)$$

este dependentă de catabolismul substraturilor provenite din alimente. Furnizarea energiei pentru ţesutul muscular, deci a capacităţii de efort, depinde de aportul, mobilizarea, transportul şi metabolismul substraturilor ce produc fosfaţi macroergici de tip ATP.

Pe de altă parte, în cursul unui efort fizic, sursele furnizării energiei (sub formă de ATP) diferă foarte mult în funcţie de intensitatea

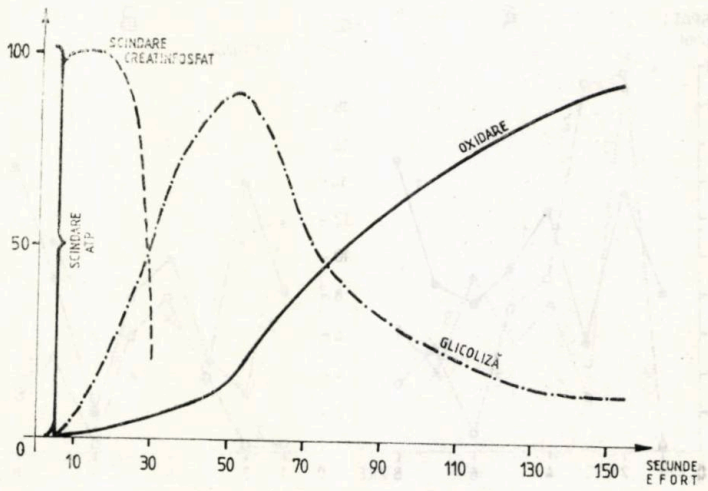


Fig. 3. — Variaţia surselor energetice în cursul unui efort muscular de scurtă durată. Ordonata conţine o scară arbitrară orientativă.

şi de durata efortului, conform schemei din figura 3, din care rezultă că, cu cît efortul este mai puternic şi mai scurt, cu atît producerea energiei prin glicoliză anaerobă este mai mare, iar cu cît efortul durează mai mult, cu atît producerea pe cale aerobă a energiei este mai mare (6). Conţinutul în ATP din muşchi este destul de mic (aproximativ 3 g/kg muşchi sau 60 g la un om de 70 kg) (7) şi se epuizează rapid (fig. 3), deoarece conţinutul în ATP din hematii nu poate constitui un criteriu al efortului muscular moderat (tabela 1).

Eliminarea urinară de fosfaţi în cursul unui efort ar putea fi corelată atît cu producerea ATP prin glicoliză, cît şi cu lactatul rezultat. În acest sens, glicoliza anaerobă furnizează 4 μmoli ATP/g muşchi, dar şi 4 μmoli lactat, pe cînd partea aerobă a glicolizei produce 80 μmoli ATP. După Krebs şi Kornberg (8), pentru un efort ce produce o creştere de lactat de 4 μmoli ATP/ml fluid la un om de 70 kg, se formează în urma degradării glucozei 0,2—0,3 moli ATP. Desigur, aceste calcule sînt aproximative, dar sugerează posibilitatea corelării eliminării urinare de fosfaţi cu alţi parametri biochimici, cum ar fi producerea de lactat. Astfel de corelaţii ar fi util de studiat şi în stări patologice, deoarece în neoplazii, iradieri (9) sau şoc hemoragic (10) supravieţuirea organismului depinde mult de capacitatea de regenerare a ATP, care este însă perturbată datorită inhibării procesului de glicoliză la diferite nivele. Rezultatele noastre oferă posibilitatea utilizării unui test cantitativ în cursul unui efort moderat, informaţiile obţinute fiind superioare celor comunicate în lucrări

recente (11), (12) avînd același scop, dar cercetînd alte căi metabolice. Studiul întreprins poate fi continuat atît practic, cît și teoretic, prin găsirea unor legături cantitative între diferiți parametri biochimici implicați în biosinteza ATP.

Prezentat la redacție
la 20 noiembrie 1982

Spitalul clinic Fundeni, București
Clinica de radiobiologie

BIOCHEMICAL MODIFICATIONS FOLLOWING PHYSICAL EXERCISE IN SPORTSMEN

SUMMARY

Some biochemical parameters were measured before and after moderate physical exercise as training in three lots of sportsmen, in order to establish a biological test of the magnitude of the effort performed. No significant modifications were found for lactate, acid-base equilibrium, triglycerides, total lipids and ATP in blood, but significant differences were observed in the elimination of inorganic phosphates in urine. The urinary elimination of phosphates expressed as phosphate/creatinine ratio permits the decrease of the influence due to diuresis and the study of the individual effort during physical training. Some correlations between the urinary elimination of phosphates and acidosis or the pathways of energy release during effort are discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. B. PERNOW, B. SALTIN, *Muscle metabolism during exercise*, Plenum Press, New York, 1971, p. 120—258.
2. E. DOOLL, J. KEUL, D. KEPLER, *Energy metabolism of human muscle*, S. Karger, Basel, 1972, cap. III și VI.
3. C. ROTARU, *Sindromul metabolic al oboselii*, Junimea, Iași, 1972.
4. S. COMOROȘAN, N. MITRICĂ, *Manual de laborator clinic*, Edit. medicală, București, 1962.
5. O. MEYERHOF, K. LOHMANN, Biochem. Z., **253**, 431 (1932).
6. N. R. ALPERT, Ann. N. Y. Acad. Sci., **119**, 995 (1965).
7. P. TROUILLION, Ed. phys., **151**, 8 (1978).
8. H. A. KREBS, H. L. KORNBERG, *Energy transformations in living matter*, Springer, Berlin, 1957.
9. R. OLINESCU, St. cerc. biochim., **17**, 47 (1974).
10. R. OLINESCU, G. CIOBA, S. NIȚĂ, St. cerc. biochim., **22**, 47 (1979).
11. P. TESCH, Acta physiol. scand., Suppl., **480**, 443 (1980).
12. I. JACOBS, Acta physiol. scand., Suppl., **495**, 1 (1981).

CERCETĂRI PRIVIND METABOLISMUL CAROTENOIDIC LA PĂSĂRI. I. METABOLISMUL CAROTENOIDIC LA PUII BROILER

DOINA OȘIANU, ELENA NICOARĂ

Rezumat. S-au studiat unele aspecte metabolice privind absorbția, transportul și depozitarea pigmenților carotenoidici la pui broiler. Absorbția și transportul pe cale sanguină ale xantofilelor se fac numai sub formă liberă, pe tractul digestiv avînd loc un proces de hidroliză a esterilor acestora. Depozitarea xantofilelor în diferite țesuturi se face atît sub formă liberă, cît și sub formă de mono- și diesteri. Acumularea xantofilelor esterificate în țesuturile periferice constituie forma de scoatere a acestora la periferia metabolismului.

În regnul animal, carotenoidele sînt pigmenții cei mai răspîndiți după melanine. Acești pigmenți apar în special la păsări, producînd pigmentarea carcaselor, a crestei, a ciocului și a penelor (1), (2), (3). Studiile efectuate de către diferiți cercetători au semnalat faptul că în organele și țesuturile analizate se găsesc cu preponderență carotenoide oxigenate ce conțin grupări oxidrilice sau cetonice (4), (5).

Pe baza experiențelor efectuate în grădini zoologice s-a ajuns la concluzia că păsările, ca și celelalte animale, nu pot să realizeze o biosinteză propriu-zisă de carotenoide, ci ele sînt tributare din acest punct de vedere regnului vegetal. Există însă indicii că păsările pot să realizeze o transformare a unor carotenoide în altele prin procese oxidative (6).

Metodele clasice de extracție a carotenoidelor din diferite țesuturi și organe utilizează reacția de saponificare și au avantajul că îndepărtează toate lipidele, care îngreuiază foarte mult prelucrarea în continuare a extractului (7). Aceste metode au însă dezavantajul că fac imposibilă precizarea unor eventuale transformări ale pigmenților carotenoidici la nivelul tractului digestiv sau în diferite țesuturi unde se depozitează aceștia.

Cu scopul evitării acestor neajunsuri, am elaborat o metodă originală de extracție a pigmenților carotenoidici din țesuturi, care evită faza de saponificare, propunîndu-ne să elucidăm unele aspecte ale metabolismului carotenoidic la păsări.

Se știe că, dintre componenții normali ai hranei păsărilor domestice, numai porumbul și făina de iarbă sau lucernă conțin oxicarotenoide (xantofile), pe care acestea le valorifică depunîndu-le în diferite țesuturi și în gălbenușul ouălor (8), (9).

Pentru început ne-am preocupat de lămurirea modului de absorbție a carotenoidelor din furajele administrate puilor broiler, precum și a unor eventuale transformări metabolice ce au loc în timpul digerării hranei, transportului și depozitării pigmenților carotenoidici la nivelul țesuturilor.

MATERIAL ŞI METODE

Pui de carne Robro în vîrstă de 50 de zile au fost împărţiţi în două loturi a cîte 30 de capete. Primul lot a primit un furaj standard, care conţinea carotenoide din porumb sub formă de xantofile libere (13,4 mg/kg), iar al doilea a fost hrănit cu acelaşi furaj, suplimentat însă cu xantofile esterificate (31 mg/kg). Cantitatea şi felul pigmenţilor carotenoidici ai acestor furaje sînt prezentate în tabela 1.

Tabela 1

Conţinutul în pigmenţi carotenoidici al furajelor utilizate

Pigmenţi	Furaj standard		Furaj + xantofile	
	mg/100 g	%	mg/100 g	%
Total	1,34	100	3,11	100
Luteină	0,62	46	0,70	22
Zeaxantină	0,56	42	0,54	17
Criptoxantină	0,11	8	0,06	2
Xantofile esterificate	0,05	4	1,81	59

Experienţa a durat 10 zile, după care au fost sacrificaţi cîte 6 pui din fiecare lot la 4 ore după ultima hrană, recoltîndu-se probe medii din sînge, ficat, piele şi grăsime subcutană. Pentru urmărirea transformărilor la nivelul tractului digestiv, s-au recoltat conţinutul guşii, al pipotei şi fecalele.

Extracţia carotenoidelor din ţesuturi. Materialul de analizat proaspăt s-a cîntărit şi s-a deshidratat cu Na_2SO_4 anhidru într-un mojar, aducîndu-se în stare de pulbere. În această stare s-a introdus într-un tub de eluţie, iar pigmenţii carotenoidici s-au extras pînă la epuizare cu un amestec de solvenţi, format din eter de petrol-eter etilic-etanol (50 : 50 : 2, în volume). Soluţia de pigmenţi a fost adusă la un volum cunoscut şi i s-a determinat concentraţia prin spectrofotometrare la un spectrofotometru Specord UV-VIS.

Separarea şi identificarea carotenoidelor. Extractele obţinute în vederea determinării cantitative a carotenoidelor totale s-au transvazat într-o pîlnie de separare şi s-au spălat pentru îndepărtarea alcoolului. Soluţiile spălate s-au uscat pe Na_2SO_4 anhidru şi s-au cromatografiat pe coloană de MgO-celită 1 : 1 (1 × 30 cm). S-a efectuat o developare îndelungată cu eter de petrol, pentru îndepărtarea lipidelor, urmată de o developare corespunzătoare în funcţie de polaritatea carotenoidelor prezente. Eluarea zonelor s-a realizat cu eter de petrol : etanol (98 : 2 v/v), soluţiile fiind aduse la volum cunoscut pentru spectrofotometrare.

În vederea identificării pigmenţilor carotenoidici separaţi s-au stabilit maximele de absorbţie în vizibil, coeficienţii de repartiţie (10), s-au efectuat cocromatograme cu pigmenţi autentici pe strat subţire şi s-au stabilit valorile Rf. Punerea în evidenţă a grupărilor OH alilice s-a făcut prin reacţie de deshidratare cu cloroform acid (11), iar punerea în evidenţă a mono- şi diesterilor s-a efectuat prin hidroliză cu KOH etanolic 5% şi urmărirea produşilor rezultaţi din timp în timp pe cromatoplăci de MgO.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În urma analizelor efectuate în cazul lotului de pui hrăniţi cu furaj standard, care conţine în proporţie de 96% xantofile libere (luteină, zeaxantină şi criptoxantină), se confirmă observaţia că în sînge carotenoidele circulă sub formă liberă (tabela 2).

În ficat se petrece, pe lîngă un proces de depozitare a pigmenţilor carotenoidici, şi un proces de esterificare cu acizi graşi. Xantofilele libere reprezintă 76%, monoesterii 14%, iar diesterii 10% din totalul acestora.

Acumularea cea mai mare de pigmenți are loc în piele, unde xantofilele libere ating abia 11% din total, restul pigmenților fiind reprezentați de monoesteri (22%) și diesteri (61%).

Tabela 2

Absorbția și depozitarea carotenoidelor la lotul 1 (mg/100 g)

Țesut analizat	Total xantofile	L	M	D	%		
					L	M	D
Sînge	0,12	0,12	—	—	100	—	—
Ficat	1,47	1,12	0,20	0,15	76	14	10
Grăsime	0,36	0,05	0,12	0,19	14	33	53
Piele	3,70	0,41	1,02	2,27	11	22	61

Notă. L=xantofile libere; M=monoesteri de xantofile; D=diesteri de xantofile.

Urmărindu-se absorbția, transportul și depozitarea carotenoidelor la lotul de pui care au fost hrăniți cu un furaj suplimentat cu carotenoide sub formă de diesteri de xantofile (tabela 3), se constată o creștere

Tabela 3

Absorbția și depozitarea carotenoidelor la lotul 2 (mg/100 g)

Țesut analizat	Total xantofile	L	M	D	%		
					L	M	D
Sînge	0,39	0,39	—	—	100	—	—
Ficat	2,12	1,58	0,22	0,32	75	10	15
Grăsime	0,65	0,06	0,19	0,40	8	30	62
Piele	10,10	1,04	2,73	6,33	10	27	63

la dublu sau la triplu a acestora față de lotul martor în toate țesuturile analizate. Acest fapt denotă că puii valorifică bine xantofilele esterificate introduse în furaj. Din datele cuprinse în tabelă se constată că absorbția și transportul xantofilelor pe cale sanguină se fac numai sub formă liberă, ceea ce înseamnă că la nivelul tractului digestiv are loc o hidroliză a esterilor de xantofile administrați în hrană.

Procesul de esterificare cu acizi grași are loc parțial în ficat și se intensifică în țesuturile periferice. Acumularea carotenoidelor în aceste țesuturi are drept urmare o pigmentare corespunzătoare a carcaselor puilor de carne. Acest fenomen s-ar putea explica prin faptul că oxicarotenoidele (xantofilele) nu îndeplinesc un rol biochimic deosebit în organismul păsărilor, cu excepția aceluia de pigmentare. De aici, tendința organismelor de respingere a acestor pigmenți la periferia metabolismului, deci în țesuturi mai puțin active biochimic.

Urmărindu-se dinamica carotenoidelor din furajul suplimentat cu diesteri de xantofile prin parcurgerea tractului digestiv (tabela 4), se

constată că încă în gușă începe un proces de hidroliză parțială a diesterilor la monoesteri, care apoi se intensifică în pipotă sub influența lipazelor.

Tabela 4

Dinamica carotenoidelor din furaj prin parcurgerea tractului digestiv (mg/100 g s. u.)

Material analizat	Total xantofile	Xantofile libere	Monoesteri	Diesteri	% L	% M	% D
Furaj + diesteri de xantofile	3,11	1,30	—	1,81	42	—	58
Conținut gușă	2,86	1,16	0,44	1,26	41	26	33
Conținut pipotă	2,58	1,39	0,65	0,54	54	25	21
Fecale	0,75	0,43	—	0,32	57	—	43

Analiza fecalelor relevă prezența xantofilelor libere și a diesterilor, care, fiind în mare exces, nu au fost hidrolizați decît în parte. Se constată de asemenea că în fecale nu apar monoesteri, ceea ce înseamnă că monoesterii formați sînt transformați total în xantofile libere, absorbite sau eliminate ca atare.

CONCLUZII

În urma rezultatelor prezentate se desprind următoarele concluzii:

1. Absorbția și transportul xantofilelor pe cale sanguină în diferite țesuturi la puii broiler se fac numai sub formă liberă, indiferent de forma în care acestea se găsesc în hrana administrată.

2. În cazul existenței în furaj a xantofilelor esterificate cu acizi grași, acestea sînt hidrolizate în tractul digestiv sub acțiunea lipazelor. Esterii de xantofile nehidrolizați sînt eliminați prin fecale.

3. Depozitarea xantofilelor în diferite țesuturi se face atît sub formă liberă cît și esterificată și este direct proporțională cu cantitatea de pigmenți din hrana administrată. Procesul de esterificare prin cuplare cu acizi grași se petrece atît în ficat, cît mai ales în țesuturile periferice (piele și grăsime subcutană).

4. Acumularea xantofilelor esterificate în țesuturile periferice constituie forma de scoatere a acestora spre periferia metabolismului. După cum se știe pînă în prezent, xantofilele nu au un rol metabolic esențial, cu excepția pigmentării corespunzătoare a carcaselor păsărilor și a ouălor produse de acestea.

Prezentat la redacție
la 25 iulie 1983

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza”,
Cluj-Napoca,
Disciplina de biochimie animală

STUDIES ON THE CAROTENOIDS METABOLISM IN POULTRY. I. THE CAROTENOIDS METABOLISM IN BROILERS

SUMMARY

There were studied some metabolic aspects regarding the absorption, transport in the blood plasma and accumulation of carotenoid pigments in broilers. The xanthophylls are absorbed and transported only in free form. In the digestive tract a hydrolysis of xanthophyll esters takes place. The accumulation of xanthophylls in the tissues occurs either in free or in esterified form (mono- and diesters). The accumulation of esterified xanthophylls in the peripheral tissues is a form of their ceasing to undergo metabolic changes.

BIBLIOGRAFIE

1. O. VÖLKER, Wiss. Veröff. Deutsch. Ges. Ernähr., **9**, 282 (1963).
2. D. L. FOX, V. E. SMITH, A. A. WOLFSON, Comp. Biochem. Physiol., **23**, 225 (1967).
3. D. L. FOX, T. S. HOPKINS, Comp. Biochem. Physiol., **17**, 841 (1966).
4. D. L. FOX, Comp. Biochem. Physiol., **6**, 305 (1962).
5. H. THOMEN, H. WAKERNAGEL, Biochim. biophys. Acta, **67**, 387 (1963).
6. O. ISLER, *Carotenoids*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1971, p. 642—644.
7. F. W. QUACKENBUSH, S. KVAKOVSZKY, S. HOOVER, T. ROGLER, J. AOAC, **48**, 1241 (1965).
8. A. L. LIVINGSTON, D. D. KUZMICKY, R. E. KNOWLES, S. O. KOHLER, Poultry Sci., **48**, 1678 (1969).
9. F. J. TAGVERKES, R. STREIFF, G. BRUBACHER, *Carotenes and carotenoids in poultry nutrition*, Proc. 12th World's Poultry Congress, Aug. 1962, Sydney, Australia, 1962, p. 177.
10. S. PETRACEK, L. ZECHMEISTER, Anal. Chem., **28**, 1484 (1956).
11. P. KARRER, E. LEUMANN, Helv. chim. Acta, **34**, 445 (1951).

CERCETĂRI PRIVIND METABOLISMUL CAROTENOIDIC LA PĂSĂRI. II. METABOLISMUL CAROTENOIDIC AL GĂINILOR OUĂTOARE

DOINA OȘIANU, ELENA NICOARĂ

Rezumat. S-a studiat metabolismul carotenoidic al găinilor ouătoare. Absorbția xantofilelor la nivelul intestinului se face sub formă liberă după hidroliza prealabilă a esterilor sub acțiunea lipazelor.
În ficat și în țesuturile periferice se depozitează atît xantofile libere, cît și mono- și diesteri. Găinile ouătoare înmagazinează plusul de xantofile din hrană în gălbenușul ouălor. Acumularea xantofilelor libere din gălbenuș se realizează treptat în tot timpul formării acestuia.

Găinile ouătoare, ca și alte păsări, depozitează pigmenții carotenoidici oxigenați din hrană în ficat, ouă, grăsime și piele (1). S-a constatat că pigmentația produselor avicole este strict dependentă de cantitatea de pigmenți carotenoidici din hrană, întrucît păsările nu sînt capabile să sintetizeze acești pigmenți (2). Pe de altă parte, felul carotenoidelor depuse în diferite țesuturi depinde de sursa naturală sau sintetică de pigmenți (3), (4). Astfel, în cazul utilizării unor surse naturale bogate în pigmenți, mai puțin uzuale, ca făina de gogoșari, de măceșe, de cătină sau diferite drojdii furajere, se constată depozitarea unor pigmenți cum sînt capsantina, capsorubina, eloxantina, violaxantina, astaxantina și diferiți caroteni (4)—(7). Ca pigmenți sintetici se utilizează cantaxantina și esterul etilic al acidului 8′-carotenoic (8), care se acumulează în țesuturi, avînd efect tinctorial deosebit.

În furajele administrate în mod uzual păsărilor, pigmenții carotenoidici preponderenți sînt așa-numitele xantofile (luteina și zeaxantina), alături de β-caroten. Dintre aceștia, xantofilele se absorb și se depun în diferite țesuturi, pe cînd β-carotenul are efect slab de pigmentare, fiind însă provitamină A.

În cadrul unui studiu privind metabolismul carotenoidic la păsări, în lucrarea de față am urmărit elucidarea unor aspecte privind absorbția, transportul și depozitarea carotenoidelor la găini ouătoare, știut fiind că acestea acumulează o cantitate apreciabilă de pigmenți în gălbenușul ouălor.

MATERIAL ȘI METODE

Găinile din rasa Roso 70 aflate în perioada de maximă intensitate a ouatului au fost împărțite în două loturi a cîte 10 capete. Lotul 1 a primit furaj ce conținea xantofile libere, provenite din porumb (15 mg/kg), iar lotul 2 furaj suplimentat cu xantofile esterificate (32 mg/kg).

Experiența a durat 14 zile, recoltîndu-se ouăle la început, după 7 zile și după 14 zile. În ultima zi, găinile au fost sacrificate și s-au recoltat sîngele, ficatul, pielea, grăsimea subcutană, precum și gălbenușurile în formare.

Extracția carotenoidelor din țesuturi s-a realizat printr-o metodă originală, evitînd faza de saponificare, iar separarea și identificarea pigmenților s-au realizat prin metodele uzuale (8).

Aprecierea pigmentației gălbenușului s-a făcut prin acordarea de note Roche, iar analiza carotenoidelor s-a realizat din probele medii după o metodă descrisă anterior (5).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Urmărindu-se transformarea carotenoidelor din furaje prin parcurgerea tractului digestiv al găinilor, se constată că xantofilele libere nu sînt modificate, ci sînt absorbite ca atare la nivelul intestinului. Xantofilele esterificate (tabela 1) suferă un proces de hidroliză, care începe

Tabela 1

Dinamica carotenoidelor din furaj prin parcurgerea tractului digestiv (mg/100 g s. u.)

Material analizat	Total xantofile	L	M	D	%		
					L	M	D
Furaj	3,20	1,44	—	1,76	45	—	55
Conținut gușă	3,06	1,34	0,54	1,18	44	18	38
Conținut pipotă	2,70	1,55	0,60	0,55	57	22	21

Notă. L = xantofile libere ; M = monoesteri de xantofile ; D = diesteri de xantofile.

chiar în gușă și se intensifică în stomacul musculos, unde cantitatea de monoesteri și de xantofile libere crește pe seama diesterilor. Procesul continuă în intestin, unde majoritatea carotenoidelor libere sînt absorbite, dovadă fiind forma sub care ele se găsesc în sînge (tabela 2).

Tabela 2

Absorbția și depozitarea carotenoidelor în țesuturi (µg/100 g)

Țesut analizat	Lotul 1				Lotul 2			
	Total xantofile	%			Total xantofile	%		
		L	M	D		L	M	D
Sînge	22	100	—	—	40	100	—	—
Ficat	511	65	23	12	763	64	22	14
Piele	563	26	8	66	636	15	17	68
Grăsime	133	10	18	72	122	8	30	62

În ceea ce privește cantitatea carotenoidelor depozitată în țesuturi (tabela 2), se constată că aceasta este sensibil apropiată în cazul celor două loturi, cu toată diferența mare de pigmenți administrați prin hrană și vehiculați prin sînge.

În ceea ce privește forma de depozitare a pigmenților, se constată, ca și în cazul puilor broiler, un proces de esterificare a acestora cu acizi grași atît în ficat, cît mai ales în țesuturile periferice.

Urmărindu-se cantitatea de pigmenți depozitată în gălbenușul ouălor produse de cele două loturi (tabela 3), se observă că, pe cînd gălbenușul ouălor lotului 1 este destul de slab pigmentat, fiind apreciat cu note între 5 și 6, cele ale lotului 2 își îmbunătățesc pigmentația

Tabela 3

Variația carotenoidelor din gălbenuș (valori medii)

Specificație	Lotul 1		Lotul 2	
	note Roche	mg/100 g carotenoide	note Roche	mg/100 g carotenoide
Începutul experienței	5,8	1,45	5,2	1,42
După 7 zile	5,0	1,28	6,4	1,64
După 14 zile	5,3	1,36	8,2	2,30

vizibil, ajungînd la note în jurul valorii 8. Aceasta se datorește evident creșterii cantității de carotenoide cu circa 60% față de lotul 1, fapt ce dovedește că plusul de carotenoide primit în hrană de lotul 2 este absorbit și depozitat aproape în exclusivitate în gălbenuș. Xantofilele depozitate în gălbenuș sînt aproape în exclusivitate sub formă liberă, esterii apărînd numai în urme.

Studiind dinamica carotenoidelor în gălbenuș în timpul formării lui (tabela 4), se constată că depozitarea are loc treptat, pe măsura matu-

Tabela 4

Dinamica carotenoidelor din gălbenuș în timpul formării acestuia (mg/100 g)

Nr. crt.	Total xantofile	Luteină	Zeaxantină	Criptoxantină
1	1,25	0,60	0,45	0,20
2	1,32	0,70	0,37	0,25
3	1,40	0,75	0,34	0,27
4	1,96	1,10	0,47	0,39
5	2,16	1,22	0,56	0,38
6	2,31	1,33	0,60	0,38
7	2,30	1,32	0,64	0,34

rizării acestuia. Se observă însă că acumularea masivă de pigmenți are loc în ultima perioadă de formare a gălbenușului. Raportul pigmenților este în favoarea luteinei, aceasta fiind pigmentul preponderent în furajul administrat găinilor.

CONCLUZII

1. Găinile ouătoare valorifică carotenoidele oxigenate din hrană, ca atare sau după o prealabilă hidroliză în tractul digestiv, depozitîndu-le în ficat, piele, grăsime și gălbenușul ouălor.

2. Depozitarea xantofilelor în țesuturi se face atît sub formă liberă, cît și sub formă de mono- și diesteri, rezultați în urma cuplării acestora cu acizi grași.

3. Cantitatea de pigmenți acumulată în țesuturi nu este corelată strîns cu cea existentă în furajul consumat de către găini.

4. Spre deosebire de puii broiler, care depozitează plusul de xantofile din furaj în ficat, piele și grăsime subcutană, găinile îl înmagazinează în gălbenușul ouălor.

5. Xantofilele din gălbenuș se găsesc sub formă liberă. Acumularea lor se face treptat în timpul formării gălbenușului, constatîndu-se însă o intensificare a procesului în perioada maturizării acestuia.

Prezentat la redacție
la 25 iulie 1983

Institutul agronomic „Dr. Petru Groza",
Cluj-Napoca,
Disciplina de biochimie animală

STUDIES ON THE CAROTENOIDS METABOLISM IN POULTRY. II. THE CAROTENOIDS METABOLISM OF LAYING HENS

SUMMARY

The metabolism of carotenoids in laying hens is studied. The absorption of xanthophylls through the intestine takes place in a free form after the previous hydrolysis of their esters under the action of lipases. In the liver and in the peripheral tissues both xanthophylls and esters were stored. The laying hens accumulate the surplus of xanthophylls in the eggs yolk. The accumulation of free xanthophylls in the eggs yolk takes place gradually, during its formation.

BIBLIOGRAFIE

1. B. C. L. WEEDON, în *Carotenoids*, sub red. O. ISLER, Birkhäuser Verlag, Basel, 1971 p. 30.
2. *Simposium „The vitamins and the carotenoids in animal nutrition"*, Kracov, 1970, p. 33.
3. D. L. FLETCHER, R. H. HARMS, D. M. JANKY, Poultry Sci., **57**, 624 (1978).
4. GH. SĂLĂJAN, V. TĂMAȘ, St. cerc. biochim., **19**, 183 (1976).
5. E. NICOARĂ, D. OȘIANU, B. DEMKÖ, St. cerc. biochim., **17**, 265 (1974).
6. G. NEAMȚU, GH. SĂLĂJAN, T. LASZLO, C. BILĂUȘ, K. L. SIMPSON, St. cerc. biochim., **20**, 63 (1977).
7. E. A. JOHNSON, M. I. LEWIS, C. R. GRAU, Poultry Sci., **59**, 1777 (1980).
8. D. OȘIANU, E. NICOARĂ, St. cerc. biochim., **27**, 75 (1984).

STUDIUL COMPORTĂRII UNOR DERIVAȚI NOI AI ALCOOLULUI POLIVINILIC RETICULAT CA SUPORT INSOLUBIL PENTRU IMOBILIZĂRI DE ENZIME

H. D. SCHELL, DANIELA BĂNĂȚEANU, TR. BENȚIA

Rezumat. Prin imobilizarea α-chimotripsinei de derivați ai alcoolului polivinilic reticulat prevăzuți cu catene laterale de diferite lungimi avînd funcțiuni carboxilice sau aminice terminale s-au obținut compuși catalitic activi cu un conținut proteic de 0,45—0,78 mg/ml gel. Activitatea enzimatică specifică zidual depinde de tipul reacției catalizate și este întotdeauna mai mare în cazul folosirii unui substrat cu greutate moleculară mai mică, cum este BTEE (activitate esterazică), decît în cazul folosirii unui substrat macromolecular, cum este cazeina (activitate proteolitică), ceea ce indică intervenția unor factori de împiedicare sterică. Acest fapt rezultă și mai clar din variația activității proteolitice în funcție de lungimea catenei laterale, ea fiind minimă la produsul rezultat prin cuplarea directă a α-chimotripsinei de matricea suportului (13%) și maximă la produsul rezultat prin cuplarea α-chimotripsinei prin intermediul unei catene formate din șase atomi de carbon (31,8%). S-a constatat totodată că α-chimotripsina imobilizată devine mai stabilă la variații de pH ale mediului de reacție și își mărește pH-ul optim de acțiune, de regulă, cu 0,5—1,0 unitate de pH.

Datorită proprietăților mecanice, chimice și economice avantajoase, preparatele imobilizate ale enzimelor și ale altor substanțe biologic active și-au asigurat un loc de frunte în biotehnologie și cercetare. O preocupare importantă a cercetărilor din acest domeniu se referă și în prezent la obținerea de suporturi insolubile adecvate pentru imobilizări de biomolecule active și la testarea comportării lor în practică sub formă de conjugate biologic active.

În lucrarea de față prezentăm rezultatele obținute cu ocazia imobilizării α-chimotripsinei (α-Cht) pe o serie de derivați noi ai alcoolului polivinilic reticulat prevăzuți cu catene laterale terminale avînd grupări carboxilice și aminice capabile să fixeze enzime și alte substanțe biologic active prin legături covalente. Am ales α-Cht, o protează care acționează atît asupra unor substrate macromoleculare (cazeină), cît și asupra unor substanțe cu greutate moleculară mică (esteri de tipul BTEE ș. a.), pentru a studia și anumite aspecte legate de intervenția unor factori de împiedicare sterică în funcție de distanța la care enzima este legată de matricea suportului insolubil.

MATERIAL ȘI METODE

Suporturile insolubile folosite la imobilizarea α-Cht au fost obținute prin cuplarea alcoolului polivinilic în stare perlată și reticulată (APV-X) cu glicocol, alanină, acid ε-aminocaproic și putresceină, produși care sînt în curs de brevetare. Ca termen de compa-

rare pentru studii referitoare la reacţiile existente între structura chimică a derivaţilor preparaţi şi activitatea catalitică a conjugatelor enzimatice insolubile obţinute, s-a legat α-Cht şi direct de matricea APV-X elaborat în laboratorul nostru (1).

Cuplarea α-Cht de APV-X s-a realizat prin metoda activării cu BrCN (2), folosind 15 ml gel perlat şi 15 mg α-Cht din pancreas bovin (Biofarm, Bucureşti), dizolvată în 10 ml soluţie de $NaHCO_3$ 0,1 M.

Cuplarea α-Cht de derivaţii APV-X prevăzuţi cu catene laterale s-a realizat prin metoda cu carbodiimidă (3), folosindu-se drept agent de cuplare 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimidă hidroclorică (EDC) (Merck-Schuchardt). În acest scop s-au folosit în reacţie 10 ml gel perlat al derivaţilor APV-X, 10 mg α-Cht dizolvată în 5 ml apă distilată şi 100 mg EDC dizolvată în 2 ml apă distilată.

Determinarea activităţii proteolitice a enzimei libere şi imobilizate s-a făcut după metoda indicată de Kunitz (4) pentru tripsină şi modificată de Rick (5) pentru cazeină.

Determinarea activităţii esterazice a enzimei libere şi imobilizate s-a realizat după indicaţiile date de Hummel (6), folosindu-se drept substrat esterul etilic al N-benzoil-L-tirozinei (BTEE) (Sigma Chemical Co.).

Cantitatea de enzimă fixată de suportul insolubil a fost determinată prin dozarea spectrofotometrică a α-Cht din mediul de reacţie înainte şi după cuplare.

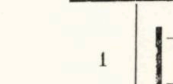
REZULTATE ŞI DISCUŢII

Derivaţii de sinteză ai alcoolului polivinilic reticulat, obţinuţi prin introducerea unor catene laterale de diferite lungimi prevăzute cu grupări carboxilice sau aminice terminale, s-au dovedit a fi suporturi insolubile adecvate pentru imobilizări de enzime. Forma şi proprietăţile lor mecanice (perle cu o rezistenţă crescută la şocuri osmotice), precum şi cele chimice (grupări funcţionale active care cuplează enzimele şi alte molecule biologic active în condiţii blinde prin legături covalente) permit folosirea lor cu succes în reactoare enzimatice atît în sistem cu flux continuu (coloane enzimatice), cît şi discontinuu (sistem batch).

Preparatele enzimatice insolubile obţinute prin legarea covalentă a α-Cht de derivaţii APV-X prevăzuţi cu catene laterale (produşii II—V) au un conţinut surprinzător de apropiat în enzimă/ml gel, cuprins între 0,46 şi 0,57 mg (tabela 1); doar derivatul I, la care enzima a fost legată direct de matricea suportului, are un conţinut mai ridicat în enzimă

Tabela 1

Conţinutul în α-Cht al derivaţilor alcoolului polivinilic reticulat

Nr. crt.	Natura derivatului	Conţinutul gelului în α-Cht mg proteină/ml gel
1	 (I)	0,78
2	—CH_2—CO—NH—enzimă (II)	0,51
3	—CH_2—CH_2—CO—NH—enzimă (III)	0,57
4	—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—CO—NH—enzimă (IV)	0,56
5	—CH_2—CH_2—CH_2—CH_2—NH—CO—enzimă (V)	0,46

(0,78 mg/ml gel). Acest fapt se datorește prezenței unui număr mai crescut de grupări active, introduse în molecula suportului cu ocazia activării sale cu BrCN.

Complet altfel se prezintă situația dacă se analizează activitatea proteolitică și esterazică specifică reziduală a conjugatelor enzimatice obținute (tabela 2). În cazul activității proteolitice se observă astfel o continuă creștere a acesteia pe măsură ce lungimea brațului intercalat

Tabela 2

Variația activității proteolitice și esterazice a α-Cht imobilizate în funcție de suportul insolubil folosit

Derivatul alcoolului polivinilic folosit	Activitatea proteolitică specifică reziduală (%) (substrat cazeină)	Activitatea esterazică specifică reziduală (%) (substrat BTEE)
I	13,0	56,0
II	17,8	30,0
III	23,2	30,0
IV	31,8	40,0
V	29,8	45,0

între enzimă și matricea suportului se mărește. Activitatea proteolitică reziduală cea mai scăzută se constată la produsul I, la care α-Cht este fixată direct pe matricea suportului insolubil (13%), iar cea mai crescută activitate proteolitică reziduală (31,8%) se observă la produsul IV, la care enzima este fixată de suport printr-un braț format din șase atomi de carbon. Această constatare indică prezența unei împiedicări sterice pe care o întîmpină enzima imobilizată în acțiunea ei asupra substratului macromolecular (cazeina), care se micșorează cu creșterea lungimii brațului ce fixează enzima de suportul insolubil, și confirmă rezultatele obținute și de alți autori cu α-Cht imobilizată de derivați ai agarozei și Sephadexului (7). Faptul că α-Cht este legată de suportul insolubil prin intermediul grupărilor ei carboxilice sau aminice libere din moleculă pare să nu aibă influență asupra activității proteolitice, activitatea proteolitică reziduală a produsului V (29,8%), cu un braț aminoterminal format din cinci atomi, situîndu-se între cea a produsului III, cu un braț carboxiterminal format din trei atomi, și cea a produsului IV, cu un braț format din șase atomi, tot carboxiterminali.

Din datele experimentale prezentate în tabela 2 rezultă totodată că activitatea catalitică reziduală a α-Cht imobilizate depinde și de natura substratului asupra căruia acționează, adică de greutatea moleculară a acestuia. Astfel, activitatea esterazică a α-Cht imobilizate, determinată pe BTEE, un substrat de sinteză cu greutate moleculară mică, este întotdeauna mai mare decît activitatea proteolitică a derivaților respectivi. Această constatare este ușor de explicat dacă se ține seama de molecula mică a substratului, care întîmpină împiedicări sterice mult mai reduse în comparație cu macromoleculele, fapt înregistrat și de alți autori

la alte tipuri de proteaze (8), (9), (10) sau la alte enzime care acţionează asupra unor substrate cu greutate moleculară mai mică şi mai mare (11).

Urmărindu-se variaţia activităţii proteolitice a conjugatelor enzimatice studiate în cadrul prezentei lucrări în funcţie de concentraţia de substrat (cazeină), se observă o comportare normală de tip Michaelis-Menten, caracteristică enzimelor avînd acţiune asupra substratelor cu greutate moleculară ridicată (tabela 3).

Tabela 3

Variaţia activităţii proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht imobilizate (µmoli tirozină/min/mg enzimă imobilizată), în funcţie de natura suportului şi de concentraţia substratului

Derivatul alcoolului polivinilic folosit	Concentraţia cazeinei din mediul de reacţie (mg %)					
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
I	416	545	630	701	780	827
II	490	588	630	706	784	833
III	438	570	614	664	701	760
IV	535	714	803	937	983	1027
V	706	760	838	900	978	1040
Enzima liberă	2175	4340	5200	6210	6500	6800

Studiindu-se variaţia activităţii proteolitice în funcţie de pH, se constată că prin imobilizare α-Cht îşi deplasează, de regulă, pH-ul optim de acţiune cu 0,5—1,0 unitate spre domeniul alcalin (tabela 4), fapt observat şi de alţi autori atît în cazul α-Cht, cît şi al altor proteaze (12)—

Tabela 4

Variaţia activităţii proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht imobilizate (µmoli tirozină/min/mg enzimă imobilizată), în funcţie de natura suportului şi de pH-ul mediului de reacţie

Derivatul alcoolului polivinilic folosit	Valoarea pH-ului din mediul de reacţie							
	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5
I	416	576	750	801	801	801	655	384
II	490	516	548	611	688	735	784	490
III	401	450	491	538	580	625	625	401
IV	939	950	982	1081	1209	1250	1250	707
V	978	1000	1038	1087	1141	1195	1195	924
Enzima liberă	1593	2096	3363	3757	4192	3525	1845	1340

(15) sau chiar al altor tipuri de enzime imobilizate (16), (17). Fenomenul este datorat micromediului creat de funcţiile chimice ale suportului sau de produşii de reacţie rezultaţi în urma acţiunii catalitice a enzimei imobilizate. Tot din tabela 4, dar mai clar din figura 1, rezultă şi faptul că prin imobilizare α-Cht prezintă un platou mai larg de activitate maximă decît enzima liberă şi devine totodată şi mai rezistentă la valori de pH situate sub sau deasupra valorii pH-ului optim de acţiune. Pentru exemplificare, amintim doar că, în timp ce enzima liberă mai păstrează la un

pH 6,0 doar 38% din activitatea ei maximă, conjugatul enzimatic V mai prezintă în aceste condiții încă 81% din activitatea sa maximă, iar la un pH 9,5, la care acest conjugat insolubil al α-Cht prezintă o activitate reziduală de 77%, enzima liberă posedă doar o activitate de 32% din cea maximă.

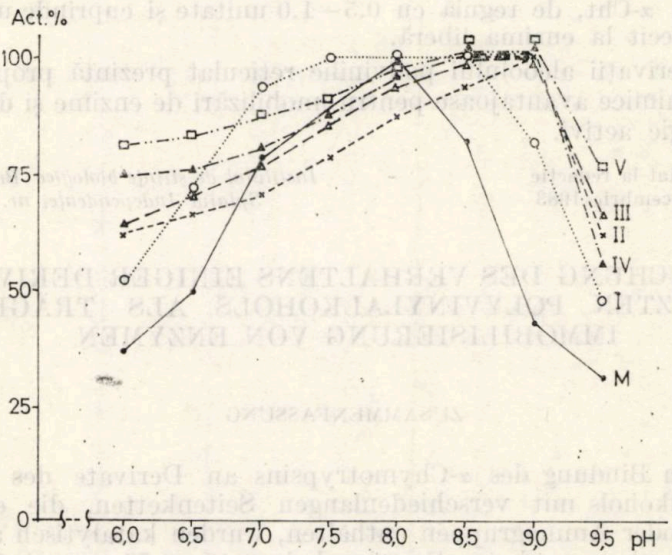


Fig. 1. — Variația activității proteolitice (substrat cazeină) a α-Cht imobilizate, în funcție de natura suportului și de valoarea pH-ului mediului de reacție.

Acest exemplu, precum și comportarea celorlalte preparate insolubile obținute confirmă constatarea general valabilă că prin imobilizare enzimele devin mai stabile față de diferite modificări ale mediului de reacție (pH, temperatură) și totodată mai rezistente față de inhibitorii lor naturali și de sinteză.

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a α-Cht de derivați ai alcoolului polivinilic reticulat se obțin produși insolubili, enzimatic activi, cu un conținut proteic de 0,46—0,78 mg/ml gel.

2. Activitatea esterazică specifică reziduală (substrat BTEE) a α-Cht imobilizate este întotdeauna mai mare decît cea proteolitică reziduală (substrat cazeină).

3. Activitatea proteolitică specifică reziduală a α-Cht (substrat cazeină) crește cu lungimea catenei laterale prin care enzima este legată covalent de molecula alcoolului polivinilic reticulat.

4. Prin imobilizare, α-Cht devine mai stabilă faţă de variaţiile de pH ale mediului de reacţie, prezentînd, în comparaţie cu o enzimă liberă nelegată, activităţi proteolitice considerabil mai crescute atît la valori situate deasupra, cît şi la cele situate sub valoarea pH-ului optim de acţiune.

5. Valoarea pH-ului optim de acţiune proteolitică creşte, în urma imobilizării α-Cht, de regulă cu 0,5—1,0 unitate şi cuprinde un domeniu mai larg decît la enzima liberă.

6. Derivaţii alcoolului polivinilic reticulat prezintă proprietăţi mecanice şi chimice avantajoase pentru imobilizări de enzime şi de alţi compuşi biologic activi.

Prezentat la redacţie
la 6 decembrie 1983

*Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti,
Splaiul Independenţei nr. 296*

UNTERSUCHUNG DES VERHALTENS EINIGER DERIVATE DES VERNETZTEN POLYVINYLALKOHOLS ALS TRÄGER ZUR IMMOBILISIERUNG VON ENZYMEN

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Bindung des α-Chymotrypsins an Derivate des vernetzten Polyvinylalkohols mit verschiedenlangen Seitenketten, die endständige Carboxyl- oder Aminogruppen enthalten, wurden katalytisch aktive Verbindungen erhalten, deren Proteingehalt 0,46—0,78 mg/ml Gel betrug. Die spezifische Restaktivität der erzielten Enzymkonjugate hängt von der Art der katalysierten Reaktion ab und liegt im Falle eines niedermolekularen Substrates, wie z. B. BTEE (Esteraseaktivität) immer höher, als im Falle eines hochmolekularen Substrates, wie z. B. Casein (proteolytische Aktivität), was auf die Anwesenheit sterischer Behinderung hinweist. Diese Tatsache geht noch klarer aus der Schwankung der proteolytischen Aktivität mit der Länge des Seitenarms hervor. Sie ist am geringsten bei der durch direkte Kupplung des α-Chymotrypsins an die Matrix des Trägers erhaltenen Verbindung (13%) und am größten bei dem durch Bindung des α-Chymotrypsins über einen C_8-Seitenarm erhaltenen Präparates (31,8%). Es konnte gleichzeitig festgestellt werden, daß das trägergebundene α-Chymotrypsin gegenüber Schwankungen des pH-Wertes im Reaktionsmilieu stabiler ist und sein pH-Optimum in der Regel um eine halbe oder eine ganze pH-Einheit dem alkalinen Bereich zu verlagert.

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, M. DIMONIE, C. V. OPRESCU, T. BENŢIA, Brevet românesc nr. 74486/1980.
2. R. AXÉN, J. PORATH, S. ERNBACK, Nature, **214**, 1302 (1967).
3. R. A. MESSING, Enzymologia, **38**, 39 (1969).
4. M. KUNITZ, J. gen. Physiol., **30**, 291 (1947).

5. W. RICK, in *Methods of enzymatic analysis*, sub red. M. U. BERGMEYER, Academic Press, New York, 1965, p. 800.
6. P. C. W. HUMMEL, Canad. J. Biochem. Physiol., **37**, 1393 (1959).
7. R. AXÉN, P. VRETBLAD, J. PORATH, Acta chem. scand., **25**, 1129 (1971).
8. R. KLEINE, P. SPANGENBERG, C. FLEMMING, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, 629 (1976).
9. T. TAKAMI, T. ANDO, Seikagaku, **40**, 749 (1968).
10. J. J. CEBRA, D. GIVOL, H. I. SILMAN, E. KATCHALSKI, J. biol. Chem., **236**, 1720 (1961).
11. H. MAEDA, H. SUZUKI, Nippon Nogeikagaku, Kaishi, **44**, 547 (1970).
12. R. AXÉN, P. A. MYRIN, C. J. JANSON, Biopolymers, **9**, 401 (1970).
13. Y. LEVIN, M. PECHT, I. GOLDSTEIN, E. KATCHALSKI, Biochemistry, **3**, 1905 (1964).
14. R. UY, V. S. H. LIU, G. P. ROYER, J. Solid-Phase Biochem., **1**, 51 (1976).
15. H. H. WEETALL, R. D. MASON, Biotechnol. Bioeng., **15**, 455 (1973).
16. T. SATO, T. MORI, T. TOSA, I. CHIBATA, Arch. Biochem. Biophys., **147**, 788 (1971).
17. A. B. PATEL, S. N. PENNINGTON, H. D. BROWN, Biochim. biophys. Acta, **178**, 626 (1969).

CERCETĂRI PRIVIND CARACTERIZAREA BIOCHIMICĂ ȘI BIOLOGICĂ A UNUI PREPARAT LACTAZIC OBȚINUT DIN *ASPERGILLUS NIGER*

ANCA ROȘEANU, ILEANA DINU*, MAGDALENA LUNGU, N. PREDA**, S. VASU***

Rezumat. Lactaza din *Aspergillus niger* a fost purificată parțial prin precipitare cu acetonă și gel-filtrare pe Sephadex G-100. În preparatele parțial purificate și în extractul proteic total s-au evidențiat și alte activități enzimatice: amilolitică, proteolitică, lipolitică, invertazică. Testele biologice au indicat absența activității mutagen-cancerigene și a afla-toxinelor B_1, B_2, G_1, G_2 în toate preparatele enzimatice considerate.

β-Galactozidaza (lactaza) este o enzimă mult studiată datorită aplicațiilor largi în domeniul medical (1) și industrial (2). Astfel, lactaza din *Lactobacillus bulgaricus* și *Kulyveromices lactis* imobilizată pe poliacrilamidă (3) este utilizată la hidroliza lactozei din zer, un subprodus al industriei laptelui. În urma acestui tratament, proprietățile nutritive ale zerului sînt mult crescute, el fiind utilizat la obținerea fie a siropului, fie a alcoolului.

În ceea ce privește lactaza fungică, o serie de studii au relevat posibilitatea utilizării enzimei la combaterea intoleranței la lactoză, determinată de deficiența în lactază (4). În acest sens, pe plan internațional, firma Bad-Homburg din R. F. Germania comercializează un preparat enzimatic, Lactase-500, obținut din *Aspergillus niger* (5).

Avînd în vedere aceste multiple posibilități de utilizare practică, ne-am preocupat de obținerea unui preparat enzimatic cu activitate lactazică din *Aspergillus niger*. În lucrarea de față sînt prezentate unele caracteristici biologice și biochimice ale produsului lactazic.

MATERIAL ȘI METODE

Obținerea și prelucrarea culturilor. Culturile de *Aspergillus niger* s-au obținut prin inocularea unui mediu de tărițe și apă de robinet (6), sterilizat în prealabil 30 min la 1,5 atm. După 5 zile de incubare la 30°C, culturile au fost suspendate în apă distilată 1 : 10 g/v și agitate 4 ore la temperatura camerei. Supernatantul obținut după centrifugare la 1000 rpm a fost supus unei purificări parțiale cu acetonă 50% și gel-filtrare pe Sephadex G-100.

Determinarea diferitelor activități enzimatice prezente în preparatul parțial purificat.

a) *Activitatea lactazică* s-a determinat prin estimarea, după metoda Burton (7), a glucozei eliberate în urma acțiunii lactazei asupra substratului natural, lactoza. O unitate de activitate enzimatică reprezintă cantitatea de enzimă care produce 1 μmol glucoză/ml/min/60 g.

b) *Activitatea α-glucozidazică (maltazică)* a fost determinată după Dahlquist (8), utilizînd ca substrat maltoza. O unitate maltazică este echivalentă cu producerea a 50 μg glucoză/ml.

c) *Activitatea amilolitică* s-a evidențiat calitativ, prin difuzie în gel de agar cu amidon solubil înglobat (9). Zonele de difuzie s-au vizualizat prin colorare cu o soluție de iod 5% în KI.

d) *Activitatea invertazică* (10) s-a determinat prin difuzie radială în gel de agar, conținînd zaharoză 5%. Colorarea s-a făcut cu o soluție de fericianură de potasiu 1% și $FeCl_3$ 0,5%. După spălare, zonele de difuzie apar colorate în albastru-verde, pe un fond galben.

e) *Activitatea lipolitică* a fost evidențiată prin difuzie în gel de agar 1%, conținînd $CaCl_2$ 0,5% și Tween 80 (11). Zonele de difuzie ale enzimei apar după 12 ore de incubare sub forma unor pete transparente pe un fond opalescent.

f) *Prezența activităților proteolitice* (9) a fost semnalată prin difuzie în gel de agar conținînd cazeină 0,1% în condiții diferite de pH, pentru proteazele acide pH 2—3, iar pentru cele alcaline pH 8,0. Evidențierea zonelor de difuzie s-a făcut utilizînd Amidoblack 0,1%.

Concentrația proteică. În preparatul enzimatic s-a determinat concentrația proteică după Lowry (12), utilizînd albumină serică bovină ca proteină standard.

Afla-toxinele B_1, B_2, G_1, G_2 s-au urmărit prin extracție cu diferiți solvenți organici, cromatografie în strat subțire, stropirea plăcilor cu acid azotic și compararea culorii și a Rf-urilor față de probe standard.

Potențialul mutagen-cancerigen s-a urmărit prin sistemul Salmonella-microzomi, după tehnica descrisă de Ames și Cann (13).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Purificarea parțială a preparatului lactazic. Extractul proteic total a fost supus precipitării cu acetonă 50% și apoi gel-filtrării pe o coloană de Sephadex G-100 (3×100 cm), echilibrată cu tampon McIlvaine 0,05 M, pH 4,0, obținîndu-se un preparat cu o activitate specifică de 5,7 UE/mg.

Alte activități enzimatice prezente în preparatul lactazic. Avînd în vedere utilizarea preparatului lactazic în terapia de substituție pentru combaterea intoleranței la lactoză, dar și ca „proteză" în procesul de refacere a mucoasei intestinale la pacienții cu diferite afecțiuni digestive, am urmărit prezența altor activități enzimatice importante din punctul de vedere al digestiei.

a) *Activitatea α-glucozidazică* (*maltazică*) a fost testată în produsul parțial purificat comparativ cu Lactase-500. Rezultatele din tabela 1 arată o bună activitate, care scade odată cu purificarea produsului lactazic. Acestea indică posibilitatea utilizării gel-filtrării pe Sephadex G-100 ca singura etapă de separare a maltazei de lactază.

Tabela 1

Activitatea maltazică a produsului glicozidazic

Proba	Activitatea enzimatică specifică (μmoli glucoză/mg)
Pudră acetonică	3,0
Produs parțial purificat	1,5
Lactase-500	0,3

b) *Activitatea amilolitică* (fig. 1) este sensibil egală pentru Lactase-500 și produsul glicozidazic parțial purificat, dar mai mică decît în pudra acetonică.

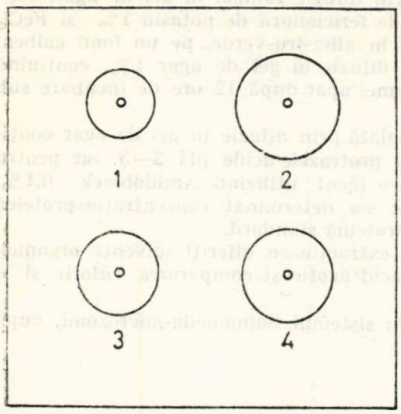


Fig. 1. — Activitatea amilolitică a diferitelor preparate lactazice: 1, extract brut; 2, pudră acetonică; 3, preparat parțial purificat; 4, Lactase-500.

c) *Activitatea invertazică* (fig. 2) este mai mare la 18 ore de incubare decît la 3 ore de incubare. Dintre produsele testate, preparatul parțial purificat prezintă activitate maximă.

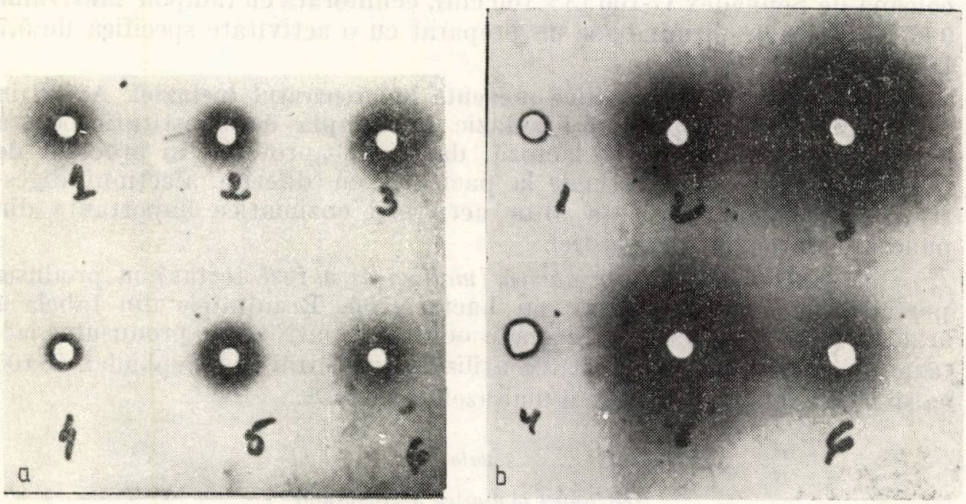


Fig. 2. — Activitatea invertazică a diferitelor preparate lactazice: *a*, 3 ore incubare; *b*, 18 ore incubare. 1, Extract brut; 2, pudră acetonică; 3, produs parțial purificat; 4, Lactase-500; 5, produs parțial purificat concentrat; 6, Lactase-500 concentrat.

d) *Activitatea lipazică* (fig. 3), testată prin difuzie radială, indică prezența acestei enzime în pudra acetonică și în mai mică măsură în produsul parțial purificat și în Lactase-500.

e) *Activitatea proteazică* (fig. 4) a fost testată la pH 2 și pH 8. În cazul proteazelor de pH acid, Lactase-500 prezintă cea mai mică activitate. La pH 8,0, produsul comercial R.F.G. are cel mai mare diametru în difuzie (d = 16 mm față de 8 mm pentru produsul purificat).

Caracterizarea biologică a preparatului glicozidazic. În vederea utilizării preparatelor glicozidazice în scop terapeutic era necesară caracterizarea lor biologică, în sensul absenței afla-toxinelor și a activității

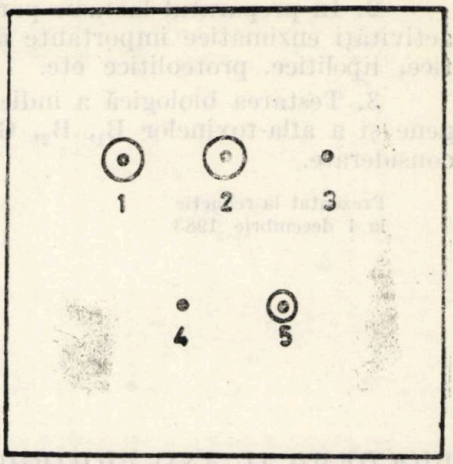


Fig. 3. — Activitatea lipolitică a diferitelor produse lactazice: 1, extract brut; 2, pudră acetonică; 3, produs parțial purificat; 4, Lactase-500; 5, produs parțial purificat concentrat.

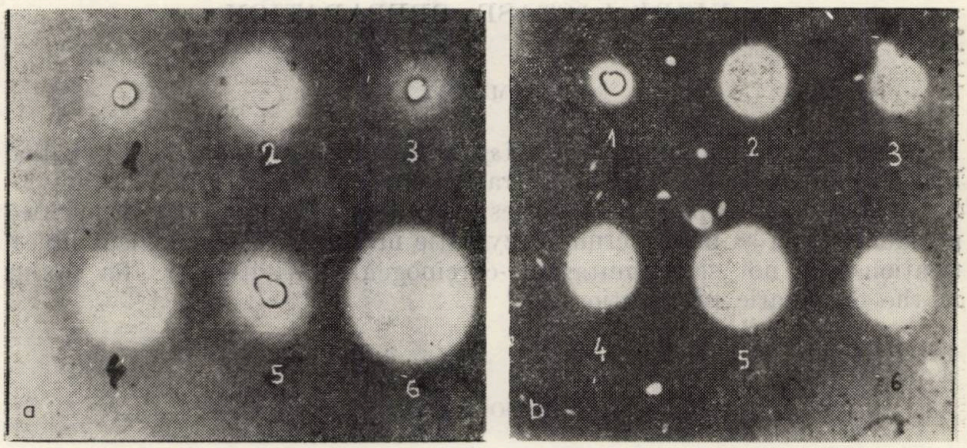


Fig. 4. — Activitatea proteolitică a diferitelor preparate lactazice: *a*, pH 2; *b*, pH 8. 1, Extract brut; 2, pudră acetonică; 3, produs parțial purificat; 4, Lactase-500; 5, produs parțial purificat concentrat; 6, Lactase-500 concentrat.

mutagene. Cultura de *Aspergillus niger* ICA-34 și preparatele glucozidazice au fost testate din acest punct de vedere.

Rezultatele au indicat pentru extractul enzimatic brut și preparatele parțial purificate lipsa afla-toxinelor B_1, B_2, G_1, G_2.

În ceea ce privește efectele mutagene, testul Ames pe tulpinile bacteriene TA_{100} și TA_{98} la concentrațiile de 0,1—1000 μg lactază/placă nu a evidențiat un număr sporit de revertanți față de martor. Rezultatele celor șase serii experimentale efectuate au condus la concluzia că preparatele lactazice testate nu prezintă activitate mutagen-cancerigenă.

CONCLUZII

1. Lactaza din *Aspergillus niger* a fost purificată parțial prin precipitare cu acetonă și prin gel-filtrare pe Sephadex G-100.

2. În preparatul lactazic parțial purificat au fost evidențiate și alte activități enzimatice importante din punct de vedere digestiv: amilolitice, lipolitice, proteolitice etc.

3. Testarea biologică a indicat absența activității mutagen-cancerigene și a afla-toxinelor B_1, B_2, G_1, G_2 în toate preparatele enzimatice considerate.

Prezentat la redacție
la 1 decembrie 1983

Institutul de științe biologice, București
* *Institutul de igienă și sănătate publică, București*
** *Institutul de medicină și farmacie, Cluj-Napoca*
și
*** *Universitatea din Galați, Facultatea TCPATP*

BIOCHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON *ASPERGILLUS NIGER* LACTASE PREPARATION

SUMMARY

The lactase obtained from *Aspergillus niger* was partially purified by acetone purification and gel filtration on Sephadex G-100. The amylolytic, proteolytic, lipolytic activities were detected in the partly purified powder as well as in the crude enzymatic mixture. The biological investigations did not show mutagenic-carcinogenic activities or afla toxins in the enzymatic preparations.

BIBLIOGRAFIE

1. O. FODOR, FL. MARIN, D. DUMITRESCU, *Recuperarea bolnavilor digestivi*, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1978.
2. Y. POMERANS, Food Technology, **16**, 690 (1964).
3. K. OHMIA, H. OHASHI, Appl. environ. Microbiol., **33**, 136 (1977).
4. J. GRYLEASKY, *Gastrointestinal problems in the infant*, W. B. Saunders Comp., London, 1975, vol. XIII.
5. * * * *Lactase-500, Zur Behandlung der primaren und sekundären Lactase intoleranz*, Fresenius Bad-Homburg (1976).
6. * * * Contract de cercetare A. S. M., 1979.
7. R. BURTON, Anal. Biochem., **14**, 258 (1966).
8. A. DAHLQUIST, Biochem. J., **80**, 354 (1961).
9. C. MUȘOLAN, S. VASU, St. cerc. biochim., **20**, 17 (1977).
10. L. MARZ, J. BARNA, J. Chromatog., **123**, 2 (1976).
11. R. G. LOWRANCE, T. F. FOYER, Nature, **213**, 1264 (1967).
12. H. O. LOWRY, J. biol. Chem., **193**, 265 (1952).
13. B. M. AMES, J. N.C. CANN, Mutation Research, **31**, 347 (1975).

PROGRESELE BIOLOGIEI ȘI BINELE UMANITĂȚII

Concepția umanist-revoluționară despre dezvoltare include efortul pentru dezvoltarea spirituală, educație, cultură, tinzînd către dezvoltarea multilaterală a omului, a filozofiei sale de om liber, într-o lume eliberată de ignoranță. Sîntem într-o perioadă în care totul arată că aplicațiile științelor vor juca în dezvoltarea societății omenești un rol din ce în ce mai important. Intervenția largă a științei și tehnicii în toate aspectele vieții oamenilor de astăzi merge accelerîndu-se din an în an și nimic nu lasă să se întrevadă că această mișcare s-ar încetini într-un viitor apropiat.

Nesecata dorință de a cunoaște, bucuria supremă de a înțelege au făcut parte din marele forțe care au orientat eforturile inteligenței omenești. Viitorul foarte promițător al progreselor științifice accelerate prin dezvoltarea erei tehniciste este și plin de pericole, dar optimismul în ceea ce privește viața oamenilor trebuie să rămînă o forță de nezdruncinat în menținerea echilibrelor dinamice ale organizărilor lumii vii.

Ca să înțelegem mai bine ce se întîmplă cu civilizația actuală trebuie să începem cu efortul de a sesiza și stăpîni complexitatea lumii vii, pentru a cunoaște perspectivele progresului omenirii, ce pot aduce diferite opțiuni și alternative de dezvoltare pentru om și pentru ameliorarea condiției sale. Omul de știință se preocupă adesea de ființa umană, de nevoile sale, de bucuriile și suferințele sale, introducînd în gîndirea sa considerații cu implicații sociale.

Științele, și în particular științele biologice, prin explozia de date informaționale asupra microcosmosului materiei vii, prin aplicațiile lor spectaculoase, au un rol determinant în evoluția civilizației umane. Progresele biologiei permit acțiunea directă a omului asupra organismelor vii, deschid perspective imense și uneori tulburătoare asupra cunoașterii.

Dacă este adevărat că biologia devine „știință de vîrf" și că ea oferă posibilitatea metodologică de a pune în evidență ansamblul mecanismelor întregii naturi prezente în sisteme organizate, trebuie să recunoaștem că întreaga biologie presupune existența organizărilor lumii vii și a armoniei cu factorii de mediu.

Ne rămîne nouă biologilor, oamenilor de știință din domeniile biologiei în primul rînd, marea răspundere să militäm pentru a impune un spirit de responsabilitate în a gîndi spre o conviețuire în armonie cu natura, pentru a orienta constructiv acțiunile noastre asupra mediului astfel încît să fie menținute, într-un echilibru dinamic, structurile complexe ale ambiantului, ale vieții.

Receptiv la nou, la progresul social al umanității, omul de știință trebuie să fie implicit un militant în munca sa, pentru ordine socială, pentru binele omului, pentru pace. Cercetătorul este cel care contribuie

prin munca sa la crearea de valori de ordin fundamental și aplicativ, valori care nu ar avea nici o rațiune într-un climat de neliniște, de amenințare a vieții și creației. Orice asemenea valoare, orice gîndire creatoare ar fi pierdută în condițiile unei amenințări distructive, fie ea nucleară sau de alt fel.

Sîntem datori ca cercetători biochimiști să militäm pentru o știință în esența ei democratică, care să convingă omenirea de necesitatea unui climat de liniște și speranță, în care datele științifice de orice natură să fie folosite spre binele umanității.

Știința trebuie să slujească omului, dezvoltării armonioase a capacității sale creatoare, realizării obiectivelor umaniste și progresiste. Esența ei generoasă, umană și democratică trebuie să se regăsească plenar în utilizările sociale, să fie generată de legile supreme ale dreptului la viață, la pace, la existență liberă, la independență.

Pentru această știință militează România socialistă, pentru această știință președintele țării noastre, tovarășul Nicolae Ceaușescu, a adresat chemarea în Mesajul către participanții la cel de-al 44-lea Simpozion internațional Pugwash din noiembrie 1983, pentru ca toate cuceririle științei să fie puse în slujba cauzei nobile a progresului umanității.

Cu nețărmurită dragoste și entuziasm ne exprimăm mîndria de a trăi și a munci în această perioadă bogată în împliniri din istoria României socialiste, inaugurată de Congresul al IX-lea al Partidului, în care concepția luminoasă și mobilizatoare a conducătorului nostru iubit, tovarășul Nicolae Ceaușescu, asupra rolului științei și tehnicii ne ajută să transpunem în viață Programul Partidului, să facem mai mult simțită contribuția științelor biologice la întărirea și dezvoltarea economiei naționale, la îmbunătățirea condiției umane, a vieții pe planeta noastră.

Sub îndrumarea tovarășei academician doctor inginer Elena Ceaușescu, strălucit coordonator al cercetării științifice pe plan național, ca președinte al Consiliului Național pentru Știință și Tehnologie, mobilizați de contribuția sa novatoare și generoasă la dezvoltarea științei, ne exprimăm angajamentul ferm de a sluji cu abnegație idealurile de civilizație și progres înscrise în documentele de partid și de stat.

Rodica Birnescu

G. ZARNEA, *Tratat de microbiologie generală*, vol. I, Edit. Academiei, Bucureşti, 1983, 426 p., 115 pl., 171 fig.

Apariţia recentă a primului volum din *Tratatul de microbiologie generală*, proiectat de autor, prof. dr. docent G. Zarnea, să cuprindă patru volume, ne îndeamnă la o amănunţită prezentare, ţinînd seama de eminentele calităţi ale lucrării. Aceasta constituie o sinteză magistrală, nu numai a complexelor cunoştinţe actuale în microbiologie, ci şi a implicaţiilor lor novatoare în domeniul biologiei moleculare, al ingineriei genetice şi al unor biotehnologii de mare rentabilitate.

Este primul tratat de microbiologie de asemenea proporţii care apare în bibliografia ştiinţifică românească. Originalitatea autorului se manifestă prin desăvîrşita sistematizare a imensei informaţii acumulate, prin interpretările sale riguroase, susţinute de o bogată ilustraţie modernă cuprinzînd numeroase scheme originale. Toate elementele textului contribuie să ne instruiască, ordinea şi precizarea cronologică a datelor accentuînd claritatea şi sobrietatea stilului.

Cartea începe cu evocarea principalelor etape istorice ale microbiologiei : descoperirea microorganismelor de la Leeuwenhoek la Pasteur, cercetările marelui savant francez despre fermentaţii, generaţia spontanee, originea microbiană a bolilor infecţioase şi imunologie. Au urmat descoperirea virusurilor, a enzimologiei microbiene, a chimioterapiei şi antibioticelor, avîntul geneticii microorganismelor şi al biologiei moleculare. În sfîrşit, este reliefată participarea lui V. Babeş, a lui I. Cantacuzino şi a institutului său la dezvoltarea ştiinţelor microbiologice.

Mai mult de jumătate din volum este apoi consacrată *Virologiei generale*, dar nu pentru că autorul consideră virusurile ca entităţile vii cele mai primitive. Dimpotrivă, el se alătură cu hotărîre concepţiei lui A. Lwoff după care particulele virale infecţioase s-au desprins devenind autonome din genomul celulelor procariote sau eucariote, ceea ce explică parazitismul lor intracelular obligatoriu pentru a se replica. De aceea, analiza aprofundată a virusurilor permite o mai deplină înţelegere a biologiei moleculare a bacteriilor şi a eucariotelor.

Privitor la anatomia virusurilor, se examinează succesiv genomul lor cu ADN sau cu ARN, capsida virală şi învelişul ei. Arhitectura moleculară a virusurilor pune în evidenţă modalităţile simetriei lor, care produc o mare diversificare a grupurilor. Sînt descrise metodele de cultură a virusurilor în diverse categorii celulare „in vitro", fazele succesive ale replicării virusurilor comportînd biosinteza proteinelor, morfogeneza virusurilor şi modul de eliminare a virionilor din celulele-gazdă în conformitate cu diferitele categorii virale.

După ce sînt arătate relaţiile complexe dintre virusuri şi celulele-gazdă, proprietăţile antivirale ale interferonilor, se discută importanta problemă a oncogenezei virale şi interesul teoretic al transcriptazei inverse. Starea subvirală a viroizilor se leagă de domeniul virusurilor de la plante.

Varietatea bacteriofagilor, lizogenia şi bazele sale moleculare sînt dezvoltat tratate deoarece, mai presus de importanţa lor bacteriologică, aceste rezultate experimentale au contribuit substanţial la edificarea geneticii moleculare. Încheierea cuprinde consideraţii generale despre natura, originea, evoluţia şi criteriile de clasificare a virusurilor.

A doua parte a volumului, intitulată *Anatomie bacteriană*, raportează conceptul de bacterie la celula procariotă, analizează caracterele sale diferenţiale faţă de celulele eucariote vegetale şi animale, se străduie să lămurească relaţiile filogenetice faţă de întreaga evoluţie a lumii vii.

Morfologia comparată a bacteriilor, relatarea proprietăţilor lor fizice precedă studiul aprofundat al ultrastructurii lor, urmărită pînă la nivel molecular şi cuprinzînd : peretele celular, protoplaşti şi sferoplaşti, spaţiul periplasmic, membrana plasmatică, mezozomi, filamentul nuclear, ribozomi, aparatul fotosintetic, incluzii metabolice, vacuole, sporii şi geneza lor, rapidozomi, magnetozomi, capsula şi stratul mucos. Deosebit de interesante sînt datele referitoare la glicocalix şi la funcţionarea flagelilor. Sînt apoi caracterizate grupurile de bacterii mai complexe : ricketsii, micoplasme, chlamidii, spirochete, mixobacterii, actinomicete. Aşa-numitele „alge albastre" sînt considerate drept cianobacterii, apte de o intensă fotosinteză, care le conferă un important rol ecologic. La sfîrşit sînt examinate procesele de diferenţiere celulară proprii bacteriilor.

Fiecare dintre cele două părți ale cărții este prevăzută cu o bibliografie selectivă.

Cuprinsul volumelor care urmează să apară sugerează cel mai viu interes. Volumul II va trata aspectele complexe de fiziologie, taxonomie și evoluție la microorganisme. Volumul III va prezenta diversitatea microorganismelor eucariote și va aprofunda problemele de genetică bacteriană și virală. Volumul IV va analiza multiplicitatea relațiilor ecologice ale microorganismelor și posibilitățile utilizării lor în variate ramuri industriale.

Succesul incontestabil al primului volum ne îndreptățește convingerea că în totalitatea lui tratatul va constitui pentru numeroși specialiști piatra de temelie a participării lor eficiente la măreața revoluție tehnico-științifică ce caracterizează actuala etapă de dezvoltare a țării noastre.

acad. Radu Codreanu

Monographs on endocrinology, vol. 25 : *The pituitary and testis. Clinical and experimental studies* (Glanda hipofiză și testicului. Studii clinice și experimentale), sub red. D.M. de KRETSER, H.G. BURGER, B. HUDSON, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York—Tokyo, 1983, 186 p., 92 fig., 17 tabele

Apariția acestei mici monografii reprezintă o serioasă contribuție adusă cunoașterii nivelului actual de dezvoltare al cercetărilor privind relațiile complexe dintre hipofiză și testicul.

Capitolele monografiei sînt intitulate astfel : Modele de secreție și metabolismul hormonilor gonadotropi ; Controlul secreției foliculinei și hormonului luteotrop ; Dezvoltarea axei hipofiză-testicul în timpul pubertății ; Schimbări în axa hipofiză-testicul cu vîrsta ; Spermatogeneza și celulele Sertoli ; Funcția celulelor Leydig ; Efectul vătămărilor testiculului asupra uncției celulelor Sertoli și Leydig.

Lucrarea cuprinde numeroase ilustrații reprezentînd secțiuni histologice și secțiuni ultrafine prin testicul în diferite stadii ale dezvoltării sau în situații experimentale. Este unificată printr-un capitol de bibliografie de 30 de pagini și un index pe subiecte.

Această carte este utilă endocrinologilor, sexologilor și celor care fac cercetări experimentale asupra axului hipofiză-testicul.

C.-C. Prunescu

D.G.R. F INDEISEN, *Allergie. Immunobiologische Fakten, Probleme und Tendenzen* (Alergie. Realități imunobiologice, probleme și tendințe), ed. a 4-a revizuită, VEB Volk und Gesundheit, Berlin, 1983, 222 p., 30 fig., 19 tabele în text

Prezenta carte de popularizare, apărută în seria „Thesaurus", dorește să-l familiarizeze pe nespecialist cu procesele biologice și ultimele descoperiri dintr-un domeniu atît de actual și de interesant cum este cel al alergiei. Faptul că această mică monografie a ajuns în prezent la a 4-a ediție (prima ediție în 1971) vorbește de la sine.

După un scurt istoric, în care cititorul face cunoștință cu primele relatări despre fenomenele alergice semnalate în scrierile medicinii antice și în cele ale medicinii galenice și în care sînt trecute în revistă și observațiile și interpretările cele mai recente din acest domeniu, autorul prezintă în capitolul 2, „Alergia — o boală sau o funcție de apărare", mai întîi bazele experimentale ale fenomenului alergic, noțiunea de alergie și problematica sa, alergia privită din punct de vedere imunobiologic, rolul limfocitelor B și T, trecînd apoi în partea a doua a acestui capitol la bolile imune cu cauzele și formele lor de manifestare.

În capitolul 3 sînt prezentate problemele limită ale alergiei, dintre care amintim mai ales afecțiunile reumatice inflamatorii ale articulațiilor, alergie și sistemul nervos, intervenția fenomenelor alergice în contracepțiune (dereglări ale fertilității) sau în urticaria de frig sau de căldură ș. a.

Capitolul 4 este dedicat unor probleme de mare actualitate și importanță practică și se referă la imunobiologia transplantărilor și a tumorilor. Tot în acest capitol a fost introdus în ediția prezentă și un aspect nou cu privire la cunoștințele imunologice dobîndite cu ocazia zborurilor în cosmos și valorificarea lor pe pămînt.

Cel de-al 5-lea și ultimul capitol se referă la măsurile complexe ce trebuie luate în vederea prevenirii bolilor imune și prezintă pe rînd rolul jucat de societate, mediul ambiant și condițiile de viață, importanța educării și autoeducării pentru un mod de viață sănătos, protecția activă a sănătății copiilor, importanța vaccinărilor ș. a.

Un capitol demn de menționat, care aduce explicații suplimentare și interesante, este cel cu privire la adnotările și sursele bibliografice.

Această monografie, scrisă într-un limbaj clar, cuprinde și o serie de scheme și figuri bine alese pentru mai buna înțelegere a celor prezentate, precum și o bibliografie selectivă în ajutorul cititorilor care doresc să aprofundeze anumite aspecte legate de problemele prezentate n text.

Horst D. Schell

Diagnosestrategien (Strategii în diagnoză), sub red. D. SCHEUCH, R. J. HASCHEN, L. NEEF VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1983, 194 p.

Volumul de față, cel de-al 43-lea din seria „Ergebnisse der experimentellen Medizin" (Rezultatele medicinii experimentale), cuprinde lucrările prezentate la simpozionul „Strategii în diagnoză", organizat între 24 și 26 septembrie 1981 la Halle de Societatea pentru chimia clinică și diagnostică de laborator a R.D.G. în colaborare cu Universitatea Martin Luthe-Halle-Wittenberg. Articolele prezentate oglindesc tendința tot mai pronunțată de a folosi în diagnosticul clinic procedee statistice care permit o evaluare obiectivă a parametrilor urmăriți.

Materialele incluse în volumul de față sînt grupate în zece capitole. După un capitol introductiv de generalități, dintre care amintim un articol deosebit de interesant cu privire la importanța diagnozei în practica clinică, se prezintă în capitolul 2 bazele matematico-statistice și folosirea metodelor statistice în testele biochimice de diagnoză.

Cel de-al 3-lea capitol se referă la diagnoza în medicina intensivă și de urgență. Urmează apoi, în ordine, capitole dedicate îmbolnăvirilor de ficat, de pancreas, bolilor metabolice, bolilor de rinichi, celor cardiovasculare, pulmonare și ale sistemului nervos central.

Articolele sînt prevăzute de regulă cu grafice, tabele și figuri și se încheie cu indicații bibliografice avînd titlurile complete din literatura de specialitate referitoare la tema discutată. Un succint index alfabetic pe subiecte completează într-un mod util acest volum, care se adresează nu numai medicilor clinicieni și de laborator, dar și biologilor' și biochimiștilor din laboratoarele de analize medicale.

Horst D. Schell

W. H. O. ERNST, E.N.G. JOOSSE van DAMME, *Umweltbelastung durch Mineralstoffe. Bioelogische Effekte* (Poluarea mediului ambiant cu substanțe minerale. Efecte biologice), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1983, 234 p., 52 fig., 4 planșe, 86 tabele

Prezenta carte, apărută în seria „Cercetarea mediului ambiant", se referă la o problemă de mare actualitate și tratează repercusiunile poluării mediului ambiant cu substanțe minerale asupra regnului animal și vegetal. Acțiunea îndelungată a unui exces de substanțe minerale poate duce la modificări considerabile ale proprietăților genetice ale organismelor și totodată poate provoca schimbări radicale ale ecosistemelor existente. Hotărîtoare pentru intensitatea acțiunii biologice a unui element mineral nu este numai concentrația sa în mediul ambiant, ci și starea fizică și chimică sub care se află și natura interacțiunilor sale cu alte elemente și clase de substanțe.

Pe baza unei literaturi de specialitate extrem de bogate (numai în domeniul metalelor grele au apărut între anii 1974 și 1981 un număr de aproape 30 000 de publicații), autorii au reușit să scrie o monografie echilibrată, bine documentată și prevăzută cu numeroase tabele și grafice sugestive.

Demn de menționat este faptul că autorii subliniază importanța redării concentrațiilor pe bază moleculară (mmol, μmol), pe care o și folosesc în text, o exprimare mult mai corectă cînd se ia în considerare efectul biologic al elementelor minerale asupra proceselor fiziologice și ecologice.

Materialul prezentat este grupat în funcţie de provenienţa substanţelor minerale poluante. Astfel, după o scurtă introducere privitoare la parametrii poluării mediului ambiant, se prezintă pe rînd contribuţia la poluarea mediului a aşezărilor omeneşti (de ex. prin reziduuri menajere, ape uzate orăşeneşti, trafic rutier etc.), a producerii de alimente şi materii prime (de ex. prin aplicarea îngrăşămintelor, a diferitelor chimicale pentru combaterea dăunătorilor etc.), a producerii de energie (de ex. prin folosirea cărbunelui, a gazelor naturale şi a petrolului) şi, în sfîrşit, a diferitelor ramuri industriale (de ex. industrii emiţătoare de gaze, pulberi, metale grele, cum sînt industriile de ciment, de metale grele sau cele producătoare de halde cu conţinut în metale grele, arsen, caolină şi de ape uzate).

De remarcat este indexul alfabetic de literatură extrem de vast, care cuprinde nu mai puţin de 55 de pagini şi în care sînt trecute titlurile întregi ale articolelor şi cărţilor citate.

Prezenta monografie, care se adresează unui cerc larg de cititori de diferite profile (biologi, ecologi, chimişti, biochimişti, agronomi, toxicologi ş. a.), se încheie cu index alfabetic pe subiecte şi mai cuprinde două tabele interesante şi utile pe partea interioară a coperţilor, unul referitor la evoluţia publicaţiilor în perioada 1975—1985, grupate pe elemente metalice, şi altul referitor la transformarea unităţilor de greutate ale celor mai importante metale din moli în ppm.

Horst D. Schell

Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, sub red. A. PIRSON, M. H. ZIMMERMAN, vol. 13 A: *Plant Carbohydrates* I. *Intracellular Carbohydrates* (Hidraţi de carbon din plante. I. Hidraţi de carbon intracelulari), editat de F. A. LOEWUS, W. TANNER, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1982, 918 p., 103 fig., 98 tabele

În noua serie a „Enciclopediei fiziologiei plantelor" a fost publicată o lucrare intitulată „Hidraţi de carbon din plante", compusă din două volume: „Hidraţi de carbon intracelulari" şi „Hidraţi de carbon extracelulari".

Această lucrare reflectă faptul că cercetările din ultima vreme au dovedit tot mai pregnant rolul esenţial pe care îl au hidraţii de carbon de pe membrana celulară ca sediu pentru importante procese biologice. Ea sistematizează rezultatele acestor cercetări, oferind cititorilor nivelul actual al cunoştinţelor în domeniul fiziologiei şi biochimiei hidraţilor de carbon din alge, ciuperci şi plante superioare.

Volumul de faţă, „Hidraţi de carbon intracelulari", este deosebit de amplu — 103 figuri, 98 de tabele şi un bogat material bibliografic — , fiind rezultatul colaborării a 28 de oameni de ştiinţă din Europa, America şi Australia. Lucrarea este constituită din trei părţi. Prima parte se ocupă cu localizarea metabolismului şi funcţiile unor zaharuri monomerice, oligomerice şi ale derivaţilor acestora. A doua parte este dedicată hidraţilor de carbon macromoleculari: amidon şi alte polizaharide de rezervă, glicoproteine, glicolipide şi sterolglicozide. Ultima parte se ocupă de procesele biologice esenţiale din plante, şi anume secreţia, acumularea şi mobilizarea rezervelor de hidraţi de carbon şi transportul acestora.

În lucrare se prezintă metode de preparare şi analiză de ultimă oră: electroforetice şi cromatografice, iar metabolismele sînt explicate pe cale enzimatică detaliat, cuprinzînd date recente.

Important este faptul că, pe lîngă concluzii, fiecare capitol cuprinde o parte finală cu cîteva întrebări la care încă nu s-a răspuns şi a căror rezolvare condiţionează dezvoltarea în continuare a acestora.

Menţionăm bogăţia deosebită a cunoştinţelor expuse şi exprimarea clară şi concisă. Bibliografia este deosebit de amplă, cuprinzînd lucrări apărute pînă în 1980, iar ilustraţia grafică este foarte sugestivă. În plus, cartea cuprinde un index de subiecte şi unul de autori, care permit o valorificare mai bună a materialului expus.

De aceea, sîntem convinşi că lucrarea se va bucura de aprecierea fiziologilor şi a biochimiştilor, dar şi a studenţilor de la facultăţile cu profil biologic şi chimic, rămînînd pentru mult timp o lucrare de referinţă în acest domeniu.

Florica Chelu

IARC Scientific Publications No. 45: *Environmental Carcinogens. Selected Methods of Analysis*, Volume 6: *N-Nitroso Compounds* (Substanțe cancerigene din mediu. Metode de analiză, vol. 6: Compușii N-nitrozați), sub red. H. EGAN, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1983, 500 p.

În continuarea volumelor apărute pînă acum privind metodele standard IARC pentru analiza unor clase de substanțe ce prezintă risc cancerigen (nitrozamine volatile, clorură de vinil, hidrocarburi aromatice policiclice, amine aromatice, micotoxine), volumul de față prezintă metodele de separare și măsurare a compușilor N-nitrozați.

Datorită potențialului cancerigen al multor compuși N-nitrozați, datorită specificității lor de organ, răspîndirii în mediul înconjurător și posibilității formării lor in vivo din amine și agenți de nitrozare, numai în anul 1981 s-au publicat peste 1400 de studii privind analiza, formarea, chimia, biochimia, metabolismul și efectele biologice ale N-nitrozocompușilor. Acești compuși prezintă activitate mutagenă și teratogenă, iar din cele peste 300 de substanțe de acest gen testate pentru cancerigenicitate peste 90% au manifestat activitate cancerigenă.

Datele oferite de acest volum sînt grupate în cinci capitole, fiecare cuprinzînd o descriere generală, urmată de metode detaliate de analiză prezentate după tipicul ISO (domeniu de aplicare, referințe, principiul metodei, reactivi, aparate, probă, metoda analitică, calcul, repetabilitate și reproductibilitate, reprezentare schematică a metodei, observații).

În primul capitol al cărții sînt arătate sursele de erori ce pot apărea la determinarea N-nitrozocompușilor (prezența nitriților și oxizilor de azot în probele de analizat constituind sursa majoră de erori) și măsurile de precauție ce trebuie luate pentru prevenirea lor.

Al doilea capitol al cărții prezintă metodele de analiză a N-nitrozaminelor volatile din aer, tutun și fumul de tutun, din malț și băuturile derivate, din hrană, nutreț, din fluidele biologice și altele (cosmetice, detergenți, cauciuc, medicamente, pesticide).

În capitolul al treilea sînt prezentate metodele de analiză pentru compușii N-nitrozo nevolatili: compușii N-nitrozo totali, N-nitrozodietanolamine (din cosmetice), acizii nitrozaminici (din produsele de conservare a cărnii și din lichide biologice).

Capitolul al patrulea descrie detaliat metodele cromatografice de separare (GC și HPLC) aplicate la produșii menționați.

Ultimul capitol al cărții prezintă tehnicile de măsurare a compușilor N-nitrozo: TEA, spectrometria de masă, polarografia, denitrozarea.

Volumul cuprinde și o bogată listă bibliografică.

Ligia Matei

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Volume 29: *Some Industrial Chemicals and Dyestuffs* (Monografiile IARC asupra evaluării riscului de cancerogeneză chimică la om, vol. 29: Unele substanțe și coloranți din industria chimică), Lyon, International Agency for Research on Cancer, mai 1982, 416 p.

Acest volum cuprinde concluziile grupului de experți IARC întruniți la Lyon între 13 și 20 octombrie 1981.

Volumul de față se referă la unele substanțe și coloranți folosiți în industria chimică.

Fiecare monografie recenzează proprietățile chimice și fizice ale substanței respective, producția și utilizările, studiile biologice de cancerogeneză.

Cele 18 monografii ale volumului cuprind: benzenul și derivați clorurați ai benzenului, amine aromatice, ftalați, adipați, eteri și coloranți pe bază de benzidină.

Dintre aceste substanțe, grupul IARC consideră că unele prezintă suficiente dovezi relativ la riscul cancerogenezei la om, iar altele prezintă numai date insuficiente sau inadecvate.

Volumul cuprinde și o anexă în care se comentează metodele folosite pentru evaluarea cantitativă a riscului cancerogenezei.

Ștefana Mogoș

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Volume 30: *Miscellaneous Pesticides* (Monografiile IARC asupra evaluării riscului de cancerogeneză chimică la om, vol. 30: Pesticide) Lyon, International Agency for Research on Cancer, ianuarie 1983, 424 p.

Volumul de față a fost elaborat în urma întrunirii experților IARC la Lyon între 15 și 22 iunie 1982 și se ocupă cu studiul diverselor pesticide.

Monografiile, care iau în considerație proprietățile fizice și chimice ale fiecărei substanțe, producția și utilizările, precum și datele biologice de evaluare a riscului cancerogenezei, cuprind următoarele clase de pesticide: insecticide (paration, malation etc.), erbicide (dialat etc.), fungicide și raticide (o-naftiltiouree).

Grupul de experți IARC consideră că unele pesticide dintre cele analizate prezintă un risc de cancerogeneză chimică susținut prin date concludente, iar pentru altele nu sînt dovezi concludente și nu s-au putut face evaluări adecvate.

Volumul cuprinde și o anexă în care se fac considerații generale asupra N-nitrozopesticidelor.

Ștefana Mogoș

Fajtakisérletezés 1978—1980 (Experimentări asupra varietăților 1978—1980), Mezögazdasägi Könyvkiadó Vállat, Budapesta, 1982, 372 p.

Lucrarea, editată de Institutul național pentru experimentări asupra varietăților din agricultură (R. P. Ungară), continuă seria altor șapte cicluri de lucrări publicate începînd cu anul 1950. Cele 30 de articole ale cărții tratează unele probleme generale și particulare privind evaluarea și performanțele unor varietăți. Cîteva dintre acestea se ocupă de aspecte generale, cum ar fi problema calității în evaluarea varietății, prelucrarea în sistem calculator a datelor rezultate din experimentări asupra varietăților, băncile de gene. Alte două articole își propun studiul comparativ al diverselor soiuri de plante din punctul de vedere al unor teste biochimice.

Sînt de asemenea abordate probleme concrete privind experimentările asupra varietăților diverselor plante și animale cu importanță economică, uneori fiind prezentate și rezultatele unor cercetări de lungă durată. Astfel se tratează problema rezistenței la boli a unor soiuri de plante (grîu, cartof, soia, ceapă), stabilitatea recoltei în funcție de soi (în cazul orzului), caracterizarea varietăților existente pe plan național (în cazul piersicului).

Articolele sînt însoțite de rezumate în limbile maghiară, rusă, engleză și germană.

Ștefan Szedlacsek

Reguliația funkții membran rastitielinih klietok (Reglarea funcțiilor membranelor celulelor de plante), „Nauka i tiehnika", Minsk, 1979, 199 p., 55 fig., 37 tabele

Volumul are ca obiect o problemă actuală a biologiei contemporane — influența factorilor fizico-chimici asupra caracteristicilor structurilor celulare și subcelulare.

Lucrarea este structurată în trei capitole, fiecare reprezentînd o cercetare independentă. În primul capitol, „Efecte membranotropice: cinetica și echilibrul", sînt expuse unele probleme generale și teoretice privind mecanismul de acțiune a membranelor biologice; în particular, acțiunea agenților membranotropici asupra caracteristicilor electrice și de difuzie ale membranei.

Al doilea capitol este consacrat studierii reacțiilor membranei celulelor absorbante ale plantelor la acțiunea diferitelor substanțe chimice, printre care: acidul indolilacetic și analogii lui, unii compuși aromatici, aminoacizi, amine biogene și derivați ai lor, baze azotate, nucleotide și nucleozide, ionofori etc., în total 11 categorii. Sînt analizate posibilitățile de detaliere a mecanismelor factorilor membranotropici asupra caracteristicilor bioelectrice ale membranelor.

În al treilea capitol sînt analizate particularități ale relației dintre membranele cloroplastelor și intensitatea fotosintezei.

Volumul este destinat celor interesați de probleme moderne ale biofizicii și fiziologiei plantelor. Cartea este utilă agrochimiștilor, precum și specialiștilor în domeniul ocrotirii naturii, farmacologilor.

Elena Bulgac

LOTHAR JÄGER, *Klinische Immunologie und Allergologie* (Imunologia și alergologia clinică), vol. I și II, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1983, 1249 p., 283 fig., 199 tabele

Cartea se adresează clinicienilor de diferite specialități. Intenția autorului este aceea de a oferi cititorului bazele științifice ale imunologiei, precum și informația asupra rolului său important în aproape toate domeniile clinice. Cea mai potrivită definiție a imunologiei clinice este dată de grupul de experți WHO și arată că: „Imunologia clinică se ocupă de acele boli care se caracterizează printr-o funcționare anormală a sistemului limfatic sau în care reacțiile imune joacă un rol apreciabil". Cartea cuprinde două părți. Partea întîi conține bazele imunologiei și cuprinde următoarele capitole: funcția generală și organizarea sistemului imun antigenele; răspunsul imun și reglarea sa; imunoglobulinele; formele reacțiilor alergice; sistemul efector nespecific al reacțiilor imune; influențarea reactivității imunologice. Partea a doua tratează despre boli generale, respectiv boli antigen specifice. Capitolele acestei părți sînt: boli imunodefective; boli imunoproliferative; amiloidoza; criopatii; transplante; boli atopice; autoimunizare; alergii medicamentoase; boala serului și șocul anafilactic; alergia alimentară; alergii la insecte; infecții; imunologia tumorilor.

Deosebit de interesante sînt părțile care tratează aspecte de genetică. Cercetările experimentale și observațiile clinice din ultimii ani au stabilit în mod clar că toate speciile care dispun de un sistem imun diferențiat conțin un complex de gene cu importanță capitală pentru imunoreactivitatea lor, denumit „complex major de histocompatibilitate" (MHC). El influențează procesele imune la diferite nivele, ca, de exemplu, reglarea răspunsului imun contra antigenelor timodependente. Acestea implică atît reacții imune umorale, cît și reacții mediate celular. Genele MHC sînt genele „răspunsului imun" (Ir). Acestea acționează asupra producerii diferiților factori, de exemplu a factorului supresor, care acționează asupra unei anumite populații celulare. Tot de MHC depinde formarea unor structuri de membrană, „antigenele de membrană", care se schimbă în celulele infectate cu virusuri sau în cele transformate malign. Aceste celule sînt recunoscute drept „străine" și pot fi distruse prin reacții imune specifice. Pe de altă parte, unele din aceste structuri de membrană a antigenelor Ia sînt dependente de genele Ir, avînd rolul de a întări interacțiunea populațiilor de limfocite cu macrofagele.

Un alt aspect deosebit de interesant de semnalat este problema cooperării dintre diferitele subpopulații de limfocite T, care a fost intens studiată în ultimii ani. Primul grup de celule T activate prin intermediul unui factor eliberat de macrofage îl constituie așa-numitele celule inductoare. Acestea formează un factor activ pe alte populații de celule T, denumit interleukin$_2$ (Il_2). Celulele T stimulate de acest factor sînt precursorii celulelor kiler, celulele supresoare sau celulele helper. Populațiile de celule enumerate pot reacționa cu Il_2 deoarece conțin pe suprafața lor receptori corespunzători, formați cu aproximativ o zi înainte prin prezentarea antigenului de alți factori eliberați de către macrofage. Pe de altă parte, aceste populații pot retroacționa după diferențierea lor în mod pozitiv (ca celule helper) sau negativ (ca celule supresoare) pe însești celulele inductoare, formînd o rețea complexă de fenomene reglatoare.

În afară de expunerea aspectelor teoretice de felul celor expuse, cartea mai cuprinde numeroase aspecte care pot fi semnificative pentru clinică, de exemplu aspecte privitoare la influențarea reacțiilor imune, a imunoproliferării, a transplantării, imunologia infecțiilor, tumorilor și a bolilor pielii condiționate imunologic.

Conținutul bogat și adus la zi al cărții este bine sistematizat și ilustrat cu numeroase scheme și tabele, care ușurează înțelegerea și asimilarea cunoștințelor expuse.

Margareta Dumitrescu

I. KROMPECHER, MARIA B. LASZLO, *Carbohydrate metabolism of tissues* (Metabolismul hidraţilor de carbon din ţesuturi), Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1983, 215 p., 154 fig., 24 tabele

Lucrarea de faţă reprezintă o monografie conţinînd rezultatele obţinute de autori după o cercetare de mai bine de 20 de ani. Autorii au studiat parametrii specifici ai celor trei căi de metabolizare a hidraţilor de carbon, şi anume : calea oxidativă, calea glicolizei fermentative şi calea metabolică asociată cu producerea unor cantităţi mari de mucopolizaharide.

Autorii au prioritate în descoperirea faptului că aceste trei căi metabolice nu au loc independent una de cealaltă şi sînt în general prezente concomitent în acelaşi ţesut, dar în grade diferite, în funcţie de structura histologică a ţesuturilor normale, de regenerare sau de diferenţiere, în condiţii experimentale sau patologice, în procesele de ontogeneză sau filogeneză.

Cercetările s-au axat pe stabilitatea unei metode de examinare comparativă a calităţii şi mărimii metabolismului tisular, ajungîndu-se la concluzia că o metodă combinată de testare a celor trei tipuri de procese metabolice pentru calitate, ca şi pentru cantitate, ar putea fi mult mai eficace decît procedeul tradiţional, care elucidează numai un singur tip de metabolism.

Prin compararea proceselor metabolice ale hidraţilor de carbon într-un număr de ţesuturi de bază, ca ochiul, muşchiul, oasele, aorta, artera carotidă şi valvulele inimii, autorii au studiat diferenţele metabolice în funcţie de structura şi fiziologia acestor ţesuturi.

Cartea discută legătura care există între metabolismul hidraţilor de carbon şi vascularizarea diferitelor ţesuturi, influenţa hormonilor asupra metabolismului hidraţilor de carbon în ţesuturi, predominanţa în grade diferite a celor trei tipuri de metabolism al hidraţilor de carbon în diferite stadii de filogeneză şi ontogeneză, efectele modificărilor în circulaţia capilară asupra celor trei tipuri de metabolism în condrogeneza experimentală şi efectul modificării metabolismului diferenţierii ţesuturilor, modificarea căilor metabolice datorită diminuării alimentării cu sînge în unele procese patologice.

Un capitol interesant al lucrării prezintă evaluarea transplantabilităţii ţesuturilor în funcţie de metabolismul hidraţilor de carbon.

Lucrarea este interesantă şi prin faptul că autorii enumeră într-un capitol toate metodele folosite în cercetările lor, unele din aceste metode fiind descrise pe scurt.

Cartea se bazează pe numeroase date experimentale originale şi pe o bogată bibliografie.

Elisabeta Mihăilescu

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viața științifică*, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : 78200, București 2, P. O. B. 2—2.

ORSZÁGOS MŰSZAKI INFORMÁCIÓS KÖZPONTI TESZTKÖNYVTÁR 1983

1984 MAI 15

ÎN EDITURA ACADEMIEI A APĂRUT:

MARCELA ZAMFIRESCU-GHEORGHIU, **Tendinţe şi direcţii de dezvoltare în biochimia medicală**

Lucrarea, bazată pe o largă informaţie şi experienţă proprie, pune în valoare necesitatea stimulării reciproce dintre biochimia fundamentală şi biochimia medicală practică, pentru rezolvarea adecvată a problemelor biologico-medicale.

Materialul, selectiv prezentat, scoate în evidenţă importanţa tendinţelor şi direcţiilor de investigaţie în domenii referitoare la: corelaţii structuri-funcţii; structura spaţiotemporală a biosistemelor; constituirea biochimiei cuantice şi a celei bioorganice cu interpretarea structurilor biochimice la nivel electronic; biochimia şi patologia radicalilor liberi cu importanţa peroxidării lipidelor; mecanismele de reglare ale vieţii celulare; bazele moleculare ale unor concepţii etiopatogenice.

Datele principale referitoare la metodologia adecvată scopului în investigaţie şi la raţionalizarea activităţii completează aspectele de problematică dominantă în ansamblul lucrării.

RM — ISSN 0049—2396

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 27, NR. 1, P. 1—106, BUCUREŞTI, IANUARIE—UNIE 1984

c. 2042 „I. P. Informaţia"

43 816

Lei 30

F1330 L:040404

studii și cercetări de biochimie

66

2

TOMUL 27

1984

IULIE — DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

S:. cerc. biochim., tomul 27, nr. 2, p. 107 — 202, 1984, București

SCBIAS 27 (2), 1984

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de două ori pe an.
În țară, abonamentele se primesc la oficiile poștale.
Cititorii din străinătate se pot abona prin ROMPRESFILATELIA, sectorul export-import presă, P.O. Box 12—201, telex 10 376 prsfi r, 78104—București, R. S. România, Calea Griviței nr. 64—66.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie", București, P.O. Box 2—2, 78200 — București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

TOMUL 27, NR. 2 1984

IULIE — DECEMBRIE

SUMAR

JEANA CIOPRAGA, OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL, Acţiunea unor ioni metalici asupra activităţii enzimatice a α-amilazei libere şi imobilizate prin legare covalentă de o membrană de colagen 109

LIDIA COPAE, ANCA ROŞEANU, MAGDALENA LUNGU, ANGELA BUCUR, Studiul unor parametri biochimici la şobolani trataţi cu β-galactozidază . . . 116

OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL, JEANA CIOPRAGA, Efectul unor ioni metalici asupra activităţii catalitice a L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferazei imobilizate în comparaţie cu enzima liberă 120

OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL, VIORICA VELEHORSCHI, SMARANDA DOBROTĂ, Imobilizarea catalazei prin legare covalentă de membrane de colagen 126

VICTORIA HERLEA, ANCA CIOLAC-RUSSU, CORINA MIHAIL, EUGENIA PANDELE, ELENA ENACHE, Efectul antibacterian al unor factori activi din colostru şi lapte uman, asociaţi în anumite raporturi 133

ŞTEFAN A. HULEA, ŞTEFANA MOGOŞ, JUNONA COLCEAG, FLORINA GROZA, Interacţiunea lectinelor cu enzimele. I. Efectul lectinei din *Pisum sativum* asupra izoperoxidazelor din hrean şi lactoperoxidazei din colostru de vacă 138

G. NEAMŢU, I. CĂBULEA, AUGUSTA LUJERDEAN, FL. IRIMIE, Cercetări biochimice asupra carotenoidelor din porumb. III. Conţinutul carotenoidelor şi al azotului total din boabele unor hibrizi de porumb diploid 143

V. OSTAFE, S. E. SZEDLACSEK, M. A. MATEESCU, Unele aspecte privind obţinerea şi comportarea amidonului reticulat ca substrat al α-amilazei 149

EUGENIA PANDELE, Interacţiunea lactoperoxidazei umane cu unele componente din lapte 158

PAULA PRUNESCU, C.- C. PRUNESCU, Incluzii nucleare şi leziuni citoplasmice în hepatocitele şoarecilor intoxicaţi cu acetat de plumb 164

LOUIS KAMEL TADROS, S. A. HULEA, CECILIA MOTAŞ, Există diferenţe între modul de degradare prin proteoliză al RN-azelor cu (RN-aza B) şi fără parte glucidică (RN-aza A) ? 168

REFERAT GENERAL

JUNONA COLCEAG, Lectine — noi perspective în biologia celulară şi în biochimia clinică 182

RECENZII 196

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

TOME 27, N° 2 1984

JULY — DECEMBER

CONTENTS

JEANA CIOPRAGA, OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL, Die Wirkung einiger Metallionen auf die Enzymaktivität der freien und der an Kollagenmembrane kovalent gebundenen α-Amylase 109

LIDIA COPAE, ANCA ROŞEANU, MAGDALENA LUNGU, ANGELA BUCUR, The study of some biochemical parameters in rats treated with β-galactosidase 116

OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL, JEANA CIOPRAGA, Die Wirkung einiger Metallionen auf die Aktivität der trägerfixierten L-alanin-2-oxoglutarat-Aminotransferase im vergleich zum freien Enzym 120

OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL, VIORICA VELEHORSCHI, SMARANDA DOBROTĂ, Trägerfixierung der Katalase durch kovalente Bindung an Kollagenmembrane 126

VICTORIA HERLEA, ANCA CIOLAC-RUSSU, CORINA MIHAIL, EUGENIA PANDELE, ELENA ENACHE, Antibacterial effect of some active factors from human colostrum and milk, coupled in various ratios 133

ŞTEFAN A. HULEA, ŞTEFANA MOGOŞ, JUNONA COLCEAG, FLORINA GROZA, Interaction of lectins with the enzymes. I. The effect of *Pisum sativum* lectin on horseraddish isoperoxidases and cow's colostrum lactoperoxidase activity. . 138

G. NEAMŢU, I. CĂBULEA, AUGUSTA LUJERDEAN, FL. IRIMIE, Biochemical researches of carotenoids in maize. III. Carotenoid and total nitrogen contents of diploid hybrid maize grains 143

V. OSTAFE, S. E. SZEDLACSEK, M. A. MATEESCU, Aspects concerning the preparation of cross-linked starch and its behavior as a substrate for α-amylase . . . 149

EUGENIA PANDELE, Interaction of human lactoperoxidase with some milk components 158

PAULA PRUNESCU, C.- C. PRUNESCU, Intranuclear inclusion bodies and cytoplasmic injuries of the hepatocytes in lead-poisoned mice 164

LOUIS KAMEL TADROS, S. A. HULEA, CECILIA MOTAŞ, Is there any difference between the pattern of proteolytic breakdown of RN-ases with (RN-ase B) and without (RN-ase A) a sugar moiety? 168

GENERAL REVIEW

JUNONA COLCEAG, Lectins — new perspectives in cellular biology and clinical biochemistry 182

REVIEWS 196

St. cerc., biochim., 27, 2, 107 — 202 (1984)

ACȚIUNEA UNOR IONI METALICI ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE A α-AMILAZEI LIBERE ȘI IMOBILIZATE PRIN LEGARE COVALENTĂ DE O MEMBRANĂ DE COLAGEN

JEANA CIOPRAGA, OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL

Rezumat. Prin imobilizarea α-amilazei pe o membrană de colagen s-a obținut un preparat enzimatic insolubil cu o activitate reziduală de 16%. Prin legarea covalentă de suportul insolubil, α-amilaza a devenit considerabil mai stabilă la acțiunea inhibitoare a ionilor metalici studiați (Zn^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}) în comparație cu enzima liberă. De remarcat comportarea deosebită a ionului de Cu, care la concentrații mici produce o creștere a activității la ambele preparate enzimatice, pentru ca apoi, la concentrații mai mari, să inhibe activitatea lor catalitică. Și în acest caz se observă însă o stabilitate mai crescută a preparatului imobilizat.

Cercetările privind rolul și implicațiile ionilor metalici în reglarea proceselor enzimatice își găsesc justificarea în aplicarea tot mai largă a preparatelor enzimatice în diverse domenii : industriile chimico-farmaceutică, alimentară, textilă, medicina umană și veterinară, agricultură.

Prin fixarea enzimelor de suporturi insolubile se obțin preparate enzimatice imobilizate, în care enzimele își păstrează activitățile lor catalitice, dobîndind în același timp și proprietăți noi, mai avantajoase pentru aplicarea lor în cercetare și practică. Determinarea efectelor specifice ale ionilor metalici asupra activității catalitice a enzimelor libere și imobilizate va permite elaborarea unor tehnologii corespunzătoare pentru utilizarea acestora în procesele industriale.

În continuarea cercetărilor anterioare privind influența ionilor metalici asupra activității enzimelor libere și imobilizate (1), (2), (3), (4), în lucrarea de față descriem comportarea α-amilazei libere și imobilizate pe membrană de colagen față de acțiunea ionilor de Zn, Ag, Pb, Ni, Cu.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe α-amilază pancreatică, furnizată de firma Carl-Roth, Karlsruhe.

Imobilizarea α-amilazei prin legare covalentă de membrană de colagen. O membrană de colagen (6 × 6 cm), îmbibată în prealabil cu soluție de NaOH 0,1 M și spălată apoi cu apă distilată pînă la pH neutru, a fost tratată cu 10 ml soluție enzimatică, conținînd 30 mg α-amilază pancreatică și 150 mg carbodiimidă solubilă (EDC). Imobilizarea a avut loc la 4—5°C, timp de 24 de ore. Conjugatul enzimatic rezultat a fost spălat alternativ cu o soluție de NaCl 0,5 M și apă distilată pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate. Pînă la folosire, membrana enzimatică a fost păstrată la rece, suspendată în apă distilată.

Determinarea activității α-amilazei. α-Amilaza a fost determinată prin metoda reductometrică descrisă de Hostettler și colab. (5). Amidonul este hidrolizat, sub acțiunea catalitică a

α-amilazei, la fragmente ale căror grupări reducătoare semiacetalice pot fi determinate cu acid 3,5-dinitrosalicilic.

Determinarea activităţii α-amilazei imobilizate s-a facut în aceleaşi condiţii ca la enzima liberă, folosindu-se însă 1 cm^2 de membrană enzimatic activă. În locul soluţiei enzimatice s-a adăugat soluţie tampon pentru realizarea aceluiaşi volum final de reacţie ca în cazul enzimei libere. Reactivul de stopare s-a introdus în mediul de reacţie după îndepărtarea membranei de colagen cuplate cu α-amilază.

Activitatea specifică a fost exprimată în μmoli maltoză/min/mg proteină la 25°C.

Efectul ionilor metalici asupra activităţii α-amilazei libere şi imobilizate. S-au studiat ionii de Zn, Pb, Ni, Cu sub forma de acetaţi şi ionul de Ag sub formă de sulfat. Cantităţile de ioni prezente în mediul de reacţie au fost următoarele :

— pentru Zn^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+} : 0,375, 0,75, 1,5, 3, 7,5, 15 μmoli ;
— pentru Ni^{2+} : 3,75, 7,5, 15, 30, 45, 60 μmoli ;
— pentru Ag^{+} : 0,0375, 0,075, 0,15, 0,30, 0,75, 1,5 μmoli.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin imobilizarea α-amilazei pe o membrană de colagen s-a obţinut un preparat insolubil de α-amilază cu o activitate reziduală de 16 %, care a servit la studierea efectului ionilor amintiţi asupra activităţii sale catalitice, comparativ cu enzima liberă.

Zincul este un microelement esenţial pentru organismele vii. Între cantităţile de zinc necesare nevoilor alimentare ale organismului şi dozele toxice există o limită largă. În cazul α-amilazei (fig. 1), cantităţile de zinc

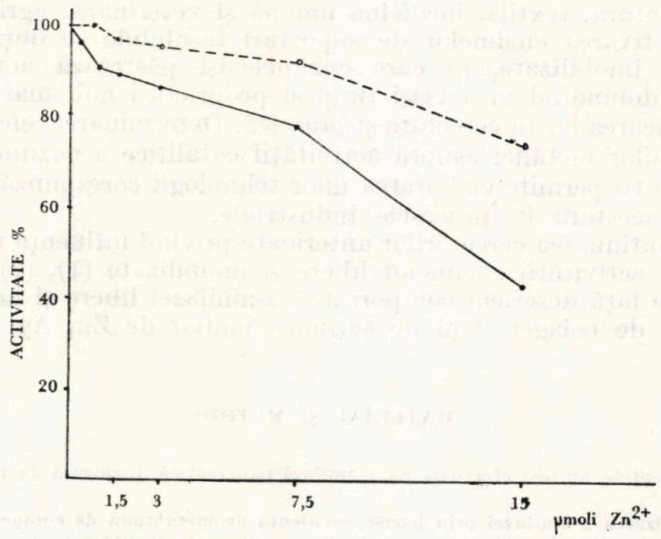


Fig. 1. — Efectul ionilor de zinc asupra activităţii α-amilazei libere (————) şi imobilizate (— — —).

luate în studiu nu afectează într-un grad prea mare activitatea celor două preparate enzimatice. Se constată că, pentru toate cantităţile de zinc utilizate, enzima imobilizată este mai rezistentă comparativ cu cea liberă. Astfel, la cantităţi de Zn^{2+} pînă la 1,5 μmoli în mediu, enzima imobilizată

nu este afectată, în timp ce enzima liberă pierde 11% din activitate. Rezistenţa mai crescută a enzimei imobilizate se menţine pentru toate cantităţile de zinc. La valoarea cantităţii maxime în mediul de reacţie (15 μmoli), în timp ce enzima imobilizată mai păstrează încă 75% din activitatea iniţială, enzimei libere îi revin doar 40%.

Ţinînd seama de faptul că prin imobilizare enzimele îşi modifică conformaţia, există posibilitatea ca în acest mod grupările —SH susceptibile de a reacţiona cu Zn^{2+} să fie mascate, conferindu-se enzimei protecţie faţă de acţiunea inhibitoare a Zn^{2+}.

Un alt ion studiat ca agent de blocare a grupărilor —SH a fost ionul de Ag (fig. 2). Acest ion avînd o tendinţă puternică de blocare a grupărilor —SH, au fost necesare cantităţi mult mai mici pentru a se observa efecte semnificative asupra vitezei reacţiei enzimatice. De remarcat că, pentru toate cantităţile studiate, activitatea enzimei scade treptat pe măsura creşterii cantităţii de Ag^+ în mediu. Activitatea enzimei imobilizate scade şi ea la început mai mult, pînă la 0,0375 μmoli Ag în mediul de reacţie, pentru ca după aceea scăderea activităţii pe măsura creşterii cantităţii ionilor de Ag să fie foarte mică, enzima imobilizată dovedindu-se şi în acest caz mai rezistentă faţă de acţiunea inhibitoare a Ag^+. La cantitatea maximă de Ag^+ utilizată (1,5 μmoli), preparatul enzimatic imobilizat mai păstrează 75% din activitatea iniţială (în absenţa efectorului), faţă de 45%, cît îi revine enzimei libere.

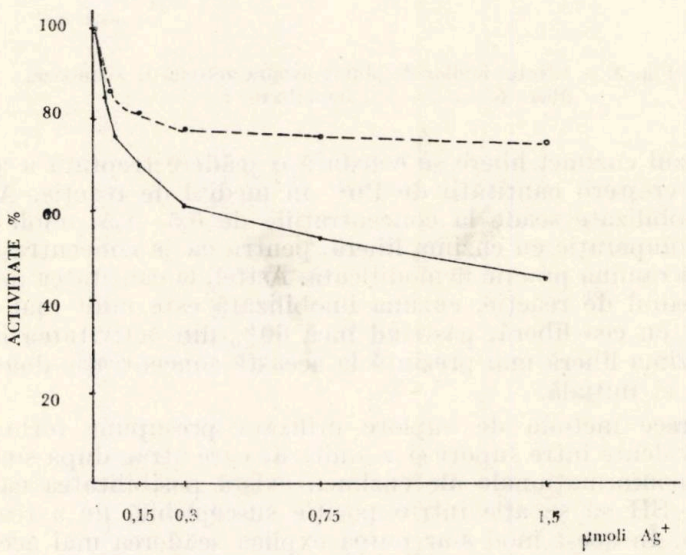


Fig. 2. — Efectul ionilor de argint asupra activităţii α-amilazei libere (————) şi imobilizate (— — —).

Plumbul este cunoscut ca toxic enzimatic datorită afinităţii sale crescute pentru grupările —SH şi fosfat ale multor enzime şi proteine de structură (6), (7). Studiile efectuate pe α-amilază au arătat că centrul catalitic activ al enzimei implică patru grupări : carboxil, tiol, un inel

imidazolic provenit de la un rest de histidină şi o grupare X hidrofilă cu rol de a orienta substratul în zona activă (8). Influenţa ionilor de Pb asupra activităţii α-amilazei libere şi imobilizate pe colagen este prezentată în figura 3.

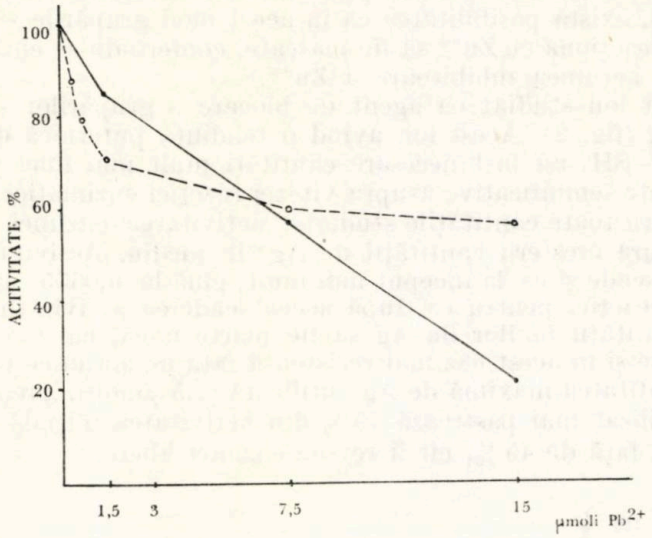


Fig. 3. — Efectul ionilor de plumb asupra activităţii α-amilazei libere (————) şi imobilizate (— — —).

În cazul enzimei libere se constată o scădere treptată a activităţii, pe măsura creşterii cantităţii de Pb^{2+} în mediul de reacţie. Activitatea enzimei imobilizate scade la concentraţiile de 0,5—1,5 μmoli Pb^{2+} mai repede în comparaţie cu enzima liberă, pentru ca la concentraţii de Pb^{2+} mai mari să rămînă practic nemodificată. Astfel, la cantitatea de 15 μmoli Pb^{2+} în mediul de reacţie, enzima imobilizată este mult mai rezistentă comparativ cu cea liberă, păstrînd încă 60% din activitatea iniţială, în timp ce enzima liberă mai prezintă la această concentraţie doar 21% din activitatea ei iniţială.

Deoarece metoda de cuplare utilizată presupune formarea unor legături covalente între suport şi α-amilază, care atrag după sine anumite modificări conformaţionale ale enzimei, există posibilitatea ca nu toate grupările —SH să se afle într-o poziţie susceptibilă de a reacţiona cu ionii de Pb. În acest mod s-ar putea explica scăderea mai accentuată a activităţii enzimei imobilizate, observată la început, urmată apoi de o diminuare practic neglijabilă a vitezei de reacţie, ca rezultat al saturării cu Pb^{2+} a grupărilor —SH expuse.

Un alt ion al cărui efect a fost urmărit a fost ionul de Ni (fig. 4). După cum se vede din figură, nichelul exercită un efect inhibitor asupra ambelor preparate enzimatice, efectul fiind mult mai pronunţat în cazul enzimei libere. Astfel, deşi în prezenţa unor cantităţi mici de Ni^{2+} enzima liberă se dovedeşte a fi ceva mai rezistentă comparativ cu cea imobilizată,

la cantități mari (45—60 μmoli) de Ni^{2+} situația se inversează. Acest fapt este sugestiv ilustrat de valorile procentuale ale activității enzimatice la cantitatea maximă de ioni prezenți în mediul de reacție. Astfel, în timp ce enzima imobilizată mai păstrează în aceste condiții încă 60% din activitatea inițială, enzima liberă este total inhibată.

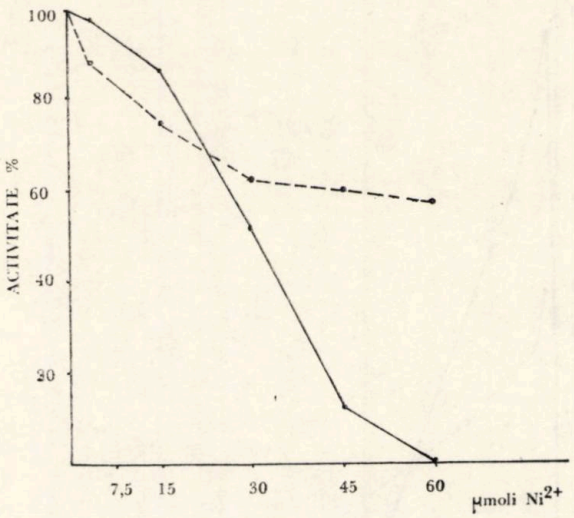


Fig. 4. — Efectul ionilor de nichel asupra activității α-amilazei libere (————) și imobilizate (— — —).

Studiind acțiunea Cu^{2+} asupra α-amilazei, s-a constatat o comportare interesantă atît sub aspectul efectelor observate, cît și al intensității acestora (fig. 5). Astfel, în cazul enzimei libere, pînă la o cantitate de 4 μmoli Cu^{2+} în mediu se observă un efect puternic activator asupra enzimei, maximul de activitate înregistrîndu-se la 0,375 μmoli Cu^{2+}, cînd activitatea α-amilazei crește cu aproximativ 160%. Această activare scade apoi rapid pe măsura creșterii cantității de Cu^{2+} în mediul de reacție, astfel încît la 7,5 μmoli Cu^{2+} enzima mai păstrează 24% din activitatea inițială, iar la 15 μmoli Cu^{2+} este complet inhibată.

Menționăm faptul că dozarea α-amilazei se face de obicei în prezența Ca^{2+}, care are un rol activator și totodată stabilizator pentru enzimă. Pentru a evita o eventuală interferență a acțiunii acestui ion cu a celor luați în studiu, cercetările noastre s-au efectuat în absența Ca^{2+}. Ionul de Cu prezent în mediu, în cantități mici, pare să suplinească rolul jucat de Ca^{2+}, ceea ce ar explica puternica activare observată în cazul enzimei libere. La cantități mari, Cu^{2+} își exercită însă efectul de blocare a grupărilor —SH, determinînd inhibarea enzimei.

În ceea ce privește enzima imobilizată, aceasta prezintă o comportare diferită de cea a enzimei libere, atît sub aspectul efectului de activare, cît și al celui de inhibiție indusă de Cu^{2+}. Efectul activator se manifestă de asemenea la 0,375 μmoli Cu^{2+} în mediul de reacție, creșterea activității fiind însă numai de 10%. Urmează apoi o diminuare a activității,

fără a se ajunge la o inhibiţie totală, ca în cazul enzimei libere. Faptul că în acest caz Cu^{2+} nu activează în aceeaşi măsură şi enzima imobilizată s-ar putea explica prin aceea că, în urma cuplării, enzima este adusă într-o stare conformaţională rigidă (prin formarea de legături covalente cu suportul), ceea ce face practic imposibile ulterioare modificări conformaţionale.

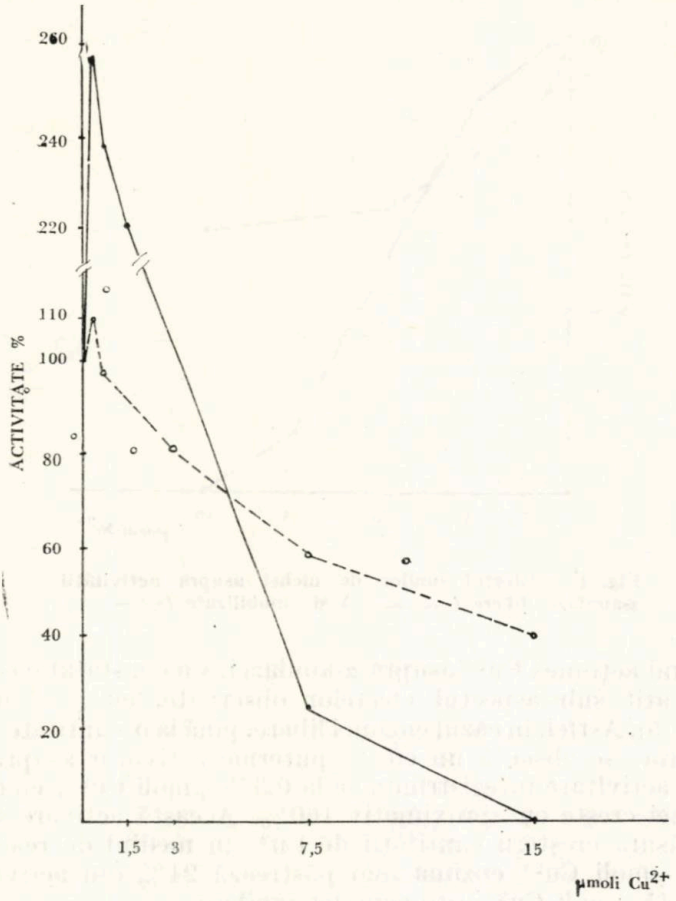


Fig. 5. — Efectul ionilor de cupru asupra activităţii α-amilazei libere (————) şi imobilizate (— — —).

La cantitatea maximă de Cu^{2+} (15 μmoli) din mediu, în timp ce enzima imobilizată mai păstrează 43 % din activitatea iniţială, activitatea enzimei libere este inhibată total.

CONCLUZII

1. Prin imobilizarea α-amilazei pe o membrană de colagen s-a obţinut un preparat insolubil, cu activitate reziduală de 16 %.
2. Prin insolubilizare, α-amilaza a devenit mai rezistentă faţă de acţiunea inhibitoare a ionilor metalici studiaţi (Zn, Ag, Pb, Ni, Cu).

3. Spre deosebire de ceilalţi ioni, Cu^{2+} exercită, în concentraţii mici, o acţiune activatoare, mai pronunţată în cazul enzimei libere.

Prezentat la redacţie
la 12 iunie 1984

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

DIE WIRKUNG EINIGER METALLIONEN AUF DIE ENZYMAKTIVITÄT DER FREIEN UND DER AN KOLLAGENMEMBRANE KOVALENT GEBUNDENEN α-AMYLASE

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Trägerfixierung der α-Amylase an eine Kollagenmembrane wurde ein unlösliches Enzympräparat mit einer Restaktivität von 16% erhalten. Durch kovalente Bindung an den unlöslichen Träger stieg die Stabilität der α-Amylase gegenüber der hemmenden Wirkung der untersuchten Metallionen (Zn^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}), im Vergleich zum freien Enzym, beträchtlich an. Zu erwähnen ist das besondere Verhalten des Cu^{2+}-Ions, das im Falle beider Enzympräparate in geringen Konzentrationen einen Anstieg der Aktivität hervorruft, um dann bei höheren Konzentrationen im Reaktionsansatz ebenfalls hemmend zu wirken, wobei auch diesmal das trägerfixierte Enzym eine größere Stabilität aufweist.

BIBLIOGRAFIE

1. OFELIA GOZIA, H. D. SCHELL, Rev. roum. Biochim., **16**, 273 (1979).
2. OFELIA GOZIA, H. D. SCHELL, VIORICA LAZĂR, OLGA MOLDOVAN, St. cerc. biochim., **26**, 40 (1983).
3. JEANA CIOPRAGA, OFELIA GOZIA, H. D. SCHELL, St. cerc. biochim., **26**, 85 (1983).
4. OFELIA GOZIA, H. D. SCHELL, JEANA CIOPRAGA, St. cerc. biochim., **27**, 120 (1984).
5. F. HOSTETTLER, E. BOREL, H. DEUEL, Helv. chim. Acta, **34**, 3132 (1951).
6. J. H. EXON, L. D. KOLLER, N. ISAACSON-KERVLIED, Arch. environ. Hlth, **34**, 469 (1979).
7. J. EISINGER, Quaterly Rev. Biophys., **46**, 437 (1978).
8. W. BANKS, C. T. GRENWOOD, *Starch and its compounds*, Edinburgh Univ. Press, 1955.

STUDIUL UNOR PARAMETRI BIOCHIMICI LA ȘOBOLANI TRATAȚI CU β-GALACTOZIDAZĂ

LIDIA COPAE, ANCA ROȘEANU*, MAGDALENA LUNGU*, ANGELA BUCUR**

Rezumat. Lactaza din *Aspergillus niger* a fost administrată la șobolani din rasa Wistar timp de 90 de zile. Dozele administrate, reprezentînd 1/10, 1/5 și 1/2 din doza maximă tolerată, nu determină modificări ale valorilor glucozei, colesterolului, lipidelor totale, proteinelor, hemoglobinei și transaminazelor din serul animalelor tratate față de martori.

Utilizarea β-galactozidazei (lactazei) (E.C. 3.2.1.23) la hidroliza lactozei din lapte sau din produși pe bază de lapte este una din cele mai promițătoare aplicații ale enzimei pentru medicină (1).

Lactoza, principalul glucid din lapte (4,8% g/v), are multe proprietăți nutritive și funcționale. Cu toate acestea, prezența ei în lapte poate crea o serie de probleme persoanelor cu deficit în lactază, lipsa enzimei determinînd un exces de lactoză, care este metabolizat de flora microbiană în colon (2). Consecințele acestei metabolizări (diaree, crampe, pierdere în greutate) devin grave mai ales la sugari, la care laptele constituie alimentul principal al dietei (3). Această problemă poate fi rezolvată printr-o terapie de substituție cu enzima deficitară, în cazul de față cu lactază.

În acest sens, pe linia preocupărilor pentru realizarea unor substanțe noi, cu proprietăți terapeutice, în laboratorul de imunochimie din cadrul Institutului de științe biologice București, s-a obținut din *Aspergillus niger* un produs enzimatic cu o bună activitate lactazică (4). Produsul, care se prezintă sub forma unei pulberi amorfe, alb-cenușie, se profilează ca un posibil substituent al lactazei în tratamentul intoleranțelor la lactoză.

În vederea introducerii preparatului lactazic în clinică, s-a impus urmărirea, în prealabil, a efectului administrării sale la șobolan. S-au efectuat, în acest sens, teste de toxicitate cronică și acută pentru a evidenția eventualele efecte secundare ale administrării unui produs de origine microbiană, parțial purificat (5).

Lucrarea de față este o completare a cercetărilor menționate și cuprinde o serie de investigații biochimice efectuate în scopul evidențierii eventualelor modificări la nivelul metabolismului glucidic, lipidic sau protidic.

MATERIAL ȘI METODE

Lactaza a fost obținută din *Aspergillus niger* printr-o tehnologie pusă la punct în cadru Institutului de științe biologice București (4).

Pentru experimentarea produsului s-au folosit șobolani tineri din rasa Wistar (crescătoria I.C.S.M.C.F.), grupați în 4 loturi a cîte 10 animale, echilibrați ca sex și greutate (95–

125 g). Produsul enzimatic a fost administrat per os, sub forma unei suspensii în lapte, timp de 90 de zile. Dozele administrate (1 g/kg corp, 2 g/kg corp şi 5 g/kg corp) reprezintă 1/10, 1/5 şi 1/2 din doza maximă tolerată.

La sfîrşitul perioadei de experimentare, în ziua sacrificării animalelor a fost recoltată urina în vederea testării glucozei şi albuminei.

Recoltarea sîngelui s-a făcut prin puncţie cardiacă, iar în serul obţinut după centrifugare s-au efectuat determinările biochimice.

Identificarea albuminei în urină s-a făcut în prezenţa unei soluţii de acid sulfosalicilic (6).

Dozarea glucozei sanguine (mg% în ser) s-a efectuat prin metoda fotometrică cu ortotoluidină (7).

Lipidele totale s-au determinat prin esterificarea acizilor graşi şi tratarea acestora cu vanilină şi acid fosforic (8), (9).

Proteinele totale (g% în ser) au fost determinate prin refractometrie, indicele de refracţie al serului fiind proporţional cu cantitatea de proteine pe care le conţine (6).

Colesterolul (mg% în ser) a fost determinat printr-un biotest colorimetric al firmei Lachema (R.S. Cehoslovacă), utilizînd colesterol standard.

Transaminazele (GOT şi GPT) s-au determinat prin metoda Reitman şi Frankel (10).

Hemoglobina a fost testată prin convertirea cantitativă în cianmethemoglobină, în prezenţa fericianurii de potasiu (11).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La sfîrşitul perioadei de administrare a preparatului lactazic, examinarea urinii la cele trei loturi de animale şi la lotul martor indică absenţa glucozei şi a albuminei.

Glucoza a fost determinată şi în ser (mg%) : martor = 56,1 ± 1,2 ; lot I = 54,6 ± 1,8 ; lot II = 50,5 ± 2,2 ; lot III = 57,5 ± 1,8. Din valorile obţinute reiese că la nici unul din loturile tratate nu au apărut modificări semnificative la nivelul glicemiei faţă de lotul martor.

Studiul influenţei administrării lactazei asupra concentraţiei lipidelor totale (mg% în ser) indică variaţii valorice nesemnificative faţă de lotul martor : martor = 260 ± 3 ; lot I = 262 ± 4 ; lot II = 262 ± 3 ; lot III = 255 ± 3.

Aceste date, completate de valorile colesterolului (mg% în ser) : martor = 56,6 ± 3 ; lot I = 56,6 ± 2,2 ; lot II = 50 ± 5,7 ; lot III = 56,6 ± 3, arată că substanţa de cercetat nu determină perturbări la nivelul metabolismului lipidic.

Rezultatele obţinute în cazul proteinelor totale ($g^0/_{00}$) şi al hemoglobinei ($g^0/_{00}$) relevă diferenţe nesemnificative ale valorilor obţinute la animalele tratate faţă de lotul martor, deci lipsa unor modificări în metabolismul protidic.

Proteine totale ($g^0/_{00}$)	Hemoglobină ($g^0/_{00}$)
Martor = 66 ± 0,6	Martor = 14,2 ± 0,5
Lot I = 68 ± 0,8	Lot I = 14 ± 0,3
Lot II = 66,2 ± 1,5	Lot II = 14,4 ± 0,1
Lot III = 66,3 ± 0,8	Lot III = 15 ± 0,1

Lipsa unor modificări ale funcţiei hepatice este relevată de valorile (UI) transaminazelor (GPT şi GOT) din serul animalelor tratate, comparativ cu valorile lotului martor :

GPT (UI)		GOT (UI)	
Martor	$= 5,8 \pm 0,4$	Martor	$= 54,5 \pm 3,1$
Lot I	$= 5,3 \pm 0,5$	Lot I	$= 46$
Lot II	$= 5,3 \pm 0,2$	Lot II	$= 45,1 \pm 0,6$
Lot III	$= 5,5 \pm 0,2$	Lot III	$= 50,25 \pm 3$

În urma acestor investigaţii, rezultă că preparatul lactazic, în dozele administrate, nu determină diferenţe semnificative ale parametrilor biochimici consideraţi. Datele prezentate se corelează cu examinările anatomopatologice, care nu au evidenţiat modificări morfopatologice cu caracter toxic.

Rezultatele obţinute relevă că într-un tratament cu preparatul lactazic nu apar creşteri ale glicemiei, perturbări ale metabolismului lipidic şi protidic sau disfuncţii hepatice.

CONCLUZII

1. Lactaza obţinută din *Aspergillus niger* a fost administrată 90 de zile la şobolani tineri în doze reprezentînd 1/10, 1/5 şi 1/2 din doza maximă tolerată.

2. Dozele administrate nu conduc la apariţia glucozei în urină sau la modificări ale glicemiei.

3. Valorile colesterolului, lipidelor totale, proteinelor totale şi hemoglobinei, determinate în serul animalelor tratate şi al animalelor martor, indică absenţa unor modificări la nivelul metabolismului lipidic şi protidic.

4. Valorile GOT şi GPT nu evidenţiază disfuncţii hepatice.

Mulţumim biologilor Ioana Gomoiu şi Jeana Neculce, din cadrul laboratorului de microbiologie al Institutului de ştiinţe biologice Bucureşti, pentru ajutorul acordat în determinările de încărcătură microbiană a produsului lactazic.

Prezentat la redacţie
la 9 iunie 1984

Institutul pentru controlul de stat al medicamentului şi cercetări farmaceutice
* *Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti*
** *Întreprinderea pentru industrializarea sfeclei de zahăr Giurgiu, Secţia acid citric*

THE STUDY OF SOME BIOCHEMICAL PARAMETERS IN RATS TREATED WITH β-GALACTOSIDASE

SUMMARY

Lactase produced by *Aspergillus niger* was administered to rats, for 90 days, the dose being 1/10, 1/5 and 1/2 of the maximum tolerated one. It does not induce any modification of the values of glucose, colesterol, lipids, proteins, hemoglobin and transaminases in the serum of treated animals as compared to the control ones.

BIBLIOGRAFIE

1. I. PAMERANZ, Food Technol., **18**, 682 (1964).
2. J. GRYBOSKI, în *Major Problems in Clinical Pediatrics*, sub red. A. SCHAFFER, W.B Saunders Comp., East Sussex, England, 1975.
3. B. GHERGHESCU, D. REBEDEA, L. BOICESCU, *Sindromul de malabsorbţie*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1982.
4. A. ROŞEANU, M. LUNGU, S. S. VASU, St. cerc. biochim., **25**, 47 (1982).
5. L. TREPCEA, V. POPA, M. ŞERBAN, A. ROŞEANU, M. LUNGU, Rev. roum. Biochim., **20**, 207 (1983).
6. P. GEORGESCU, E. PĂUNESCU, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Edit. medicală, Bucureşti, 1960.
7. E. HULMANN, Nature, **193**, 108 (1969).
8. N. ZULLNER, K. HIRSCH, Z. Ges. exp. Med., **135**, 545 (1962).
9. T. POSMA, J. A. P. STORES, Clin. chim. Acta, **22**, 596 (1968).
10. S. REITMAN, S. FRANKEL, Amer. J. clin. Path., **28**, 56 (1957).
11. * * * *Metode de laborator de uz curent*, Comisia de standardizare, Academia de ştiinţe medicale, 1974.

EFECTUL UNOR IONI METALICI ASUPRA ACTIVITĂȚII CATALITICE A L-ALANIN-2-OXOGLUTARAT-AMINOTRANSFERAZEI IMOBILIZATE ÎN COMPARAȚIE CU ENZIMA LIBERĂ

OFELIA GOZIA, HORST D. SCHELL, JEANA CIOPRAGA

Rezumat. Prin imobilizarea L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferazei pe o membrană de colagen s-a obținut un preparat enzimatic insolubil cu o activitate reziduală de 13,8%. Prin imobilizare, L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferaza a devenit considerabil mai rezistentă față de acțiunea inhibitoare a ionilor metalici studiați (Zn^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}), în comparație cu enzima liberă. Spre deosebire de ionii de Cu, ionii de Zn, Mg și Mn produc, în concentrații mici, un efect de creștere a activității catalitice, care este mai pronunțat în cazul enzimei imobilizate.

Numeroase studii de biologie celulară au arătat că toate celulele, indiferent de originea lor, își desfășoară activitatea într-un mediu preponderent anorganic, care, făcînd abstracție de apă, constituie componenta chimică principală (1).

Ionii metalici prezenți în acest mediu au funcții multiple în desfășurarea metabolismului celular. Mulți dintre ionii componenți ai acestui mediu participă la reacții ce au loc în celulă în concentrații asemănătoare altor metaboliți organici obișnuiți. Alți ioni joacă un rol catalitic, fiind priviți drept componente ale enzimelor și sistemelor enzimatice. Totodată, ionii metalici pot avea un rol important și în menținerea homeostaziei la toate nivelele de organizare ale organismului : țesuturi, celule, organite subcelulare, componente macromoleculare.

În același timp, în cadrul proceselor tehnologice industriale de rafinare, ca și în cazul unor tratamente chimice ale alimentelor, poate avea loc o sărăcire a acestora în elemente esențiale, ca Mg, Cr, Mn, Co, Ca, Zn, Mo, Fe, Se; de asemenea, nu este exclusă posibilitatea contaminării alimentelor în cursul prelucrărilor cu elemente toxice.

În ultimii ani s-a observat, în cadrul tehnologiilor bazate pe enzime, o tendință marcată de înlocuire a preparatelor enzimatice libere cu cele imobilizate pe suporturi insolubile datorită multiplelor lor avantaje. La aceasta se poate adăuga și faptul că enzimele imobilizate sînt mai puțin sensibile față de acțiunea unor inhibitori, printre care se înscriu și unii ioni metalici.

De aceea, în lucrarea de față am studiat influența unor ioni metalici asupra activității L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferazei (GPT) libere și imobilizate pe membrană de colagen.

St. cerc. biochim., 27, 2, 120—125 (1984)

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele au fost efectuate pe GPT purificat din ficat de şobolan (2).

Imobilizarea GPT prin legare covalentă de membrane de colagen. O membrană de colagen (6 × 6 cm), îmbibată în prealabil cu o soluţie de NaOH 0,1 M şi spălată apoi cu apă distilată pînă la pH neutru, a fost tratată cu 4,2 mg GPT şi 150 mg carbodiimidă solubilă (EDC), dizolvate în 8 ml apă distilată. Imobilizarea a avut loc la 4—5°C, timp de 24 de ore. Conjugatul enzimatic rezultat a fost apoi spălat alternativ cu o soluţie de NaCl 0,5 M şi apă distilată, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate. Pînă la folosire, membrana enzimatică a fost păstrată la rece, suspendată în apă distilată.

Determinarea activităţii GPT s-a făcut colorimetric dupa metoda Reitman şi Frankel (3), folosindu-se în cazul enzimei imobilizate 1 cm^2 membrană de colagen. Activitatea enzimatică a fost exprimată în µmoli piruvat/min/mg proteină la 37°C.

Efectul ionilor metalici asupra activităţii GPT libere şi imobilizate s-a studiat urmărindu-se reacţia enzimatică în prezenţa ionilor de Zn (0,2—2 mM), Mg (5—30 mM), Mn (5—30 mM) şi Cu (0,1—0,6 mM pentru enzima liberă şi o concentraţie de zece ori mai mare, şi anume 1—6 mM, pentru enzima imobilizată) sub formă de sulfaţi.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin imobilizare s-a obţinut un preparat insolubil de GPT cu o activitate reziduală de 13,8%, care a servit la studiul efectului ionilor amintiţi asupra activităţii catalitice, comparativ cu enzima liberă.

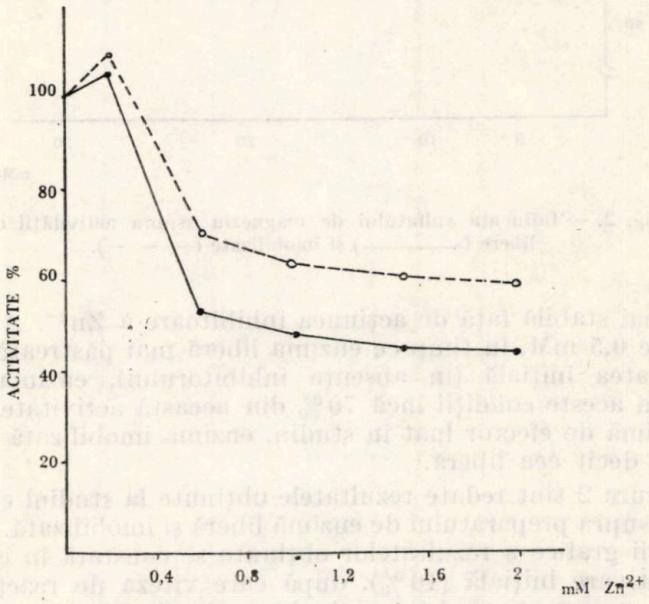


Fig. 1. — Efectul concentraţiilor sulfatului de zinc asupra activităţii GPT libere (————) şi imobilizate (— — —).

Efectul ionilor de Zn asupra activităţii GPT libere şi imobilizate este prezentat în figura 1.

Domeniul de concentraţie ales pentru Zn^{2+} s-a situat între 0,2 şi 2 mM, deoarece reacţia a avut loc în tampon fosfat la pH alcalin (8,5),

evitîndu-se în acest fel apariţia în mediul de reacţie a precipitatului de $Zn(OH)_2$. După cum rezultă din figura 1, ambele preparate enzimatice sînt activate la concentraţii mici de Zn^{2+} (0,2 mM) în mediul de reacţie. Cu creşterea concentraţiei ionului, se constată însă o scădere a activităţii ambelor preparate enzimatice. De remarcat este faptul că enzima imobili-

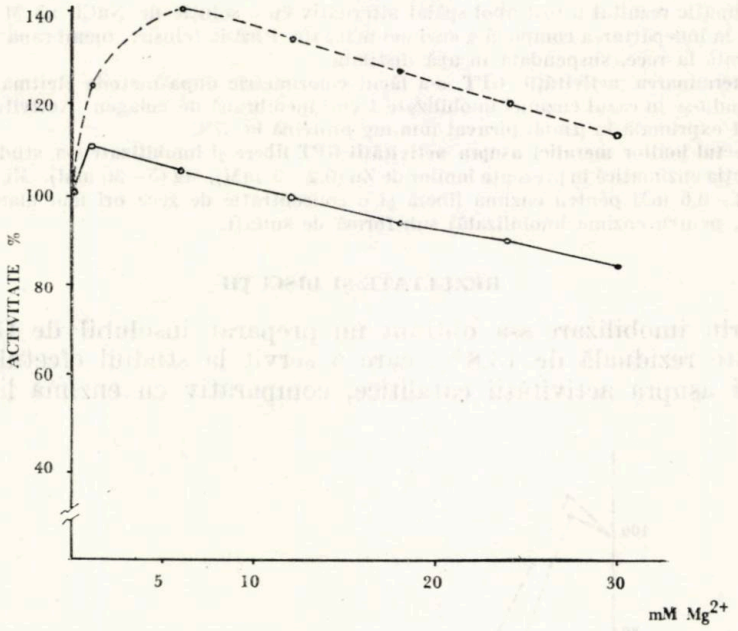


Fig. 2. — Influenţa sulfatului de magneziu asupra activităţii GPT libere (————) şi imobilizate (— — —).

zată este mai stabilă faţă de acţiunea inhibitoare a Zn^{2+}. Astfel, la concentraţia de 0,5 mM, în timp ce enzima liberă mai păstrează doar 53% din activitatea iniţială (în absenţa inhibitorului), enzima imobilizată păstrează în aceste condiţii încă 70% din această activitate. La concentraţia maximă de efector luat în studiu, enzima imobilizată este cu 15% mai activă decît cea liberă.

În figura 2 sînt redate rezultatele obţinute la studiul efectului ionilor de Mg asupra preparatului de enzimă liberă şi imobilizată. Din analiza reprezentării grafice a rezultatelor obţinute se constată în cazul enzimei libere o activare iniţială (10%), după care viteza de reacţie începe să scadă uşor, enzima păstrînd totuşi, la concentraţia finală de 30 mM Mg^{2+}, încă 85% din activitatea iniţială. În ceea ce priveşte enzima imobilizată se observă din nou că prin insolubilizare rezistenţa enzimei faţă de acţiunea inhibitoare a ionilor metalici creşte. Astfel, spre deosebire de enzima liberă, preparatul de enzimă imobilizată nu este inhibat de Mg^{2+} pe domeniul de concentraţie studiat. Activitatea preparatului imobilizat creşte cu 40% la concentraţia de 6 mM, după care procesul de activare începe

să scadă, preparatul rămînînd totuşi, la concentraţia finală a Mg^{2+}, cu 20% mai activ decît martorul.

Studiindu-se efectul ionilor de Mn asupra activităţii GPT libere şi imobilizate, se constată o comportare asemănătoare cu cea întîlnită în cazul Mg^{2+} (fig. 3). Astfel, la concentraţii mici de Mn^{2+}, enzima liberă

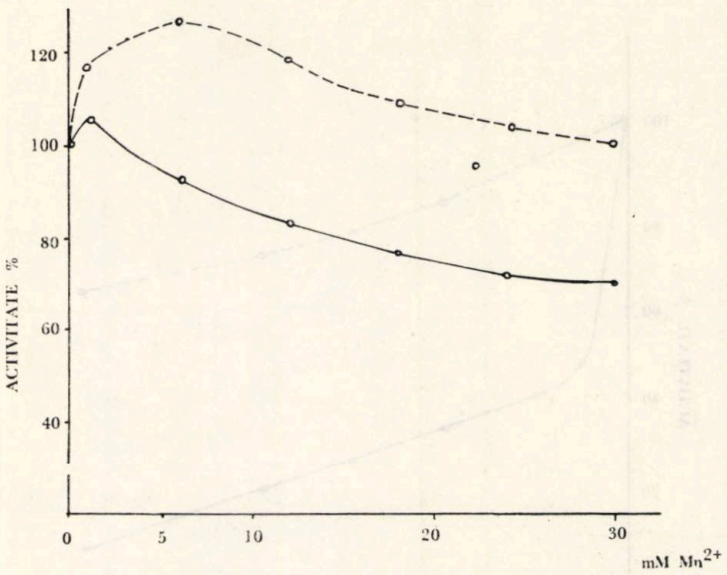


Fig. 3. — Influenţa sulfatului de mangan asupra activităţii GPT libere (————) şi imobilizate (— — —).

prezintă o uşoară activare (5%), după care activitatea ei începe să scadă la început brusc, apoi mai lent, la concentraţia de 30 mM Mn^{2+} păstrînd încă 70% din activitatea iniţială.

În ceea ce priveşte enzima imobilizată, se constată că aceasta nu este afectată negativ de ionii de Mn pe domeniul de concentraţie studiat. De această dată, efectul activator al Mn^{2+} este însă ceva mai scăzut decît în cazul Mg^{2+}, la concentraţia de 6 mM Mn^{2+} constatîndu-se o activare de numai 30%. Activitatea enzimatică scade apoi pe măsura creşterii concentraţiei ionului de Mn în mediul de reacţie, pentru ca la concentraţia de 30 mM Mn^{2+} enzima să atingă din nou valoarea activităţii martorului.

În continuare, prezentăm rezultatele obţinute la studiul efectului ionului de Cu asupra activităţii catalitice a GPT (fig. 4). Trebuie subliniat în acest caz că domeniul de concentraţie al ionului de Cu nu a putut fi ales identic pentru enzima liberă şi cea imobilizată datorită stabilităţii remarcabile a acesteia din urmă faţă de Cu^{2+}. De aceea, pentru enzima liberă a fost ales un domeniu de concentraţie situat între 0,1 şi 0,6 mM, iar pentru enzima imobilizată un domeniu situat între 1 şi 6 mM.

În cazul ambelor preparate enzimatice se constată o scădere treptată a activităţii catalitice pe măsura creşterii concentraţiei efectorului, panta curbei reprezentînd scăderea activităţii enzimei libere, însă mult mai abruptă în comparaţie cu cea a enzimei imobilizate. Merită subliniată deosebita rezistenţă pe care enzima o dobîndeşte în urma cuplării ei

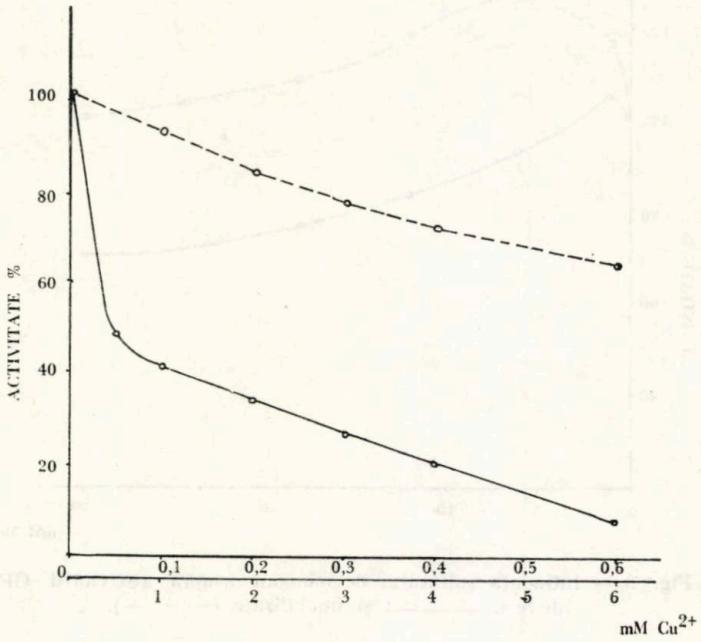


Fig. 4. — Efectul sulfatului de cupru asupra activităţii GPT libere (————) şi imobilizate (— — —).

pe un suport insolubil, faţă de acţiunea inhibitoare a ionilor de Cu. Acest fapt este clar ilustrat nu numai de domeniile de concentraţie ale efectorului utilizate pentru ambele enzime, ci şi de valorile activităţilor procentuale ale celor două preparate la concentraţiile maxime de Cu^{2+}.

Astfel, dacă enzima liberă mai păstrează 8% din activitatea iniţială la concentraţia de 0,6 mM Cu^{2+}, enzima imobilizată nu este afectată semnificativ la această concentraţie; chiar la o concentraţie de Cu^{2+} de zece ori mai mare, enzima imobilizată mai păstrează 65% din activitatea prezentată în absenţa inhibitorului.

Efectul inhibitor al Cu^{2+} se poate explica prin faptul că GPT este o —SH enzimă, sensibilă faţă de reactivii care pot bloca aceste grupări. Rezistenţa deosebită a enzimei, dobîndită în urma cuplării ei pe un suport insolubil, s-ar putea datora efectului protector pe care îl conferă suportul acestor grupări, făcîndu-le greu sau deloc accesibile reacţiei Cu^{2+}.

CONCLUZII

1. Prin imobilizarea L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferazei pe o membrană de colagen s-a obţinut un preparat enzimatic insolubil cu o activitate reziduală de 13,8%.

2. În comparaţie cu enzima liberă, cea imobilizată este mai rezistentă faţă de acţiunea inhibitoare a ionilor metalici studiaţi.

3. Ionii de Zn, Mg şi Mn produc în concentraţii mici un efect de creştere asupra activităţii catalitice, efect mult mai pronunţat în cazul enzimei imobilizate.

4. În urma imobilizării, L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferaza devine mai rezistentă faţă de acţiunea inhibitoare a Cu^{2+}, fiind necesare, în cazul enzimei imobilizate, concentraţii de zece ori mai mari pentru a se observa efectul inhibitor al acestui ion.

Prezentat la redacţie
la 12 iulie 1984

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

DIE WIRKUNG EINIGER METALLIONEN AUF DIE AKTIVITÄT DER TRÄGERFIXIERTEN L-ALANIN-2-OXOGLUTARAT-AMINOTRANSFERASE IM VERGLEICH ZUM FREIEN ENZYM

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Trägerfixierung der L-Alanin-2-oxoglutarat Aminotransferase an eine Kollagenmembrane wurde ein unlösliches Enzympräparat mit einer Restaktivität von 13,8% erhalten. Durch kovalente Bindung an den unlöslichen Träger gewann die L-Alanin-2-oxoglutarat Aminotransferase, im Vergleich zum freien Enzym, an Beständigkeit gegenüber der hemmenden Einwirkung der untersuchten Metallionen (Zn^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}). Zum Unterschied von den Cu^{2+}-Ionen führen geringe Konzentrationen der übrigen untersuchten Ionen zu einem Anstieg der katalytischen Aktivität, der beim trägergebundenen Enzym ausgeprägter ist.

BIBLIOGRAFIE

1. I. GRECU, MARIA NEAMŢU, I. ENESCU, *Implicaţii biologice şi medicale ale chimiei anorganice*, Edit. Junimea, Iaşi, 1982.
2. H. D. SCHELL, OFELIA GOZIA, St. cerc. biochim., **22**, 187 (1979).
3. S. REITMAN, S. FRANKEL, Amer. J. Clin. Path., **28**, 56 (1957).

IMOBILIZAREA CATALAZEI PRIN LEGARE COVALENTĂ DE MEMBRANE DE COLAGEN

OFELIA GOZIA, JEANA CIOPRAGA, HORST D. SCHELL, VIORICA VELEHORSCHI, SMARANDA DOBROTĂ

Rezumat. Prin imobilizarea catalazei din *Streptomyces* sp. pe membrane de colagen în prezența carbodiimidei solubile (EDC), s-a obținut un preparat enzimatic insolubil cu o activitate catalitică de 1,1 mmoli H_2O_2/min/mg proteină. În urma imobilizării, catalaza devine mai termostabilă și mai rezistentă față de variațiile de pH și de concentrații ridicate de H_2O_2 și poate fi folosită de repetate ori fără să-și piardă din activitate.

Catalaza (E.C. 1.11.1.6) face parte din clasa oxidoreductazelor și catalizează reacția de descompunere a peroxidului de hidrogen, conform reacției :

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalază}} 2\ H_2O + O_2$$

Enzima prezintă o înaltă specificitate și este larg răspîndită atît la plantele și animalele superioare, cît și la aproape toate microorganismele aerobe.

În cazul microorganismelor, enzima este intracelulară, punerea ei în libertate necesitînd liza pereților celulari.

Avînd în vedere multiplele aplicații ale enzimelor fixate pe suporturi insolubile, în lucrarea de față descriem modul de obținere și caracteristicile unui preparat de catalază realizat prin imobilizarea enzimei pe membrană de colagen. Literatura de specialitate prezintă cîteva preparate de catalază imobilizate pe diferite suporturi, cum ar fi : Ti_2O_3 poros (1), ceramică cu pori controlați (1), perle de sticlă (2), microîncapsulare (3), celuloză activată cu BrCN (4) ș.a.

MATERIAL ȘI METODE

Tulpina de *Streptomyces* sp. înalt producătoare de catalază a fost obținută în cadrul laboratorului de microbiologie al Institutului de științe biologice București.

Producerea de catalază de către această tulpină s-a testat prin cultivarea ei pe diferite medii, sursele de azot fiind reprezentate de făina de soia, șrot de floarea-soarelui și șrot de soia.

Mediile de cultură au fost inoculate cu 5% inocul, reprezentat de o cultură de 48 de ore în mediu mineral. Tulpinile au fost cultivate submers, pe agitatoare rotative, la 28°C (5)

Pentru a cunoaşte perioada optimă de producere a enzimei, tulpinile au fost cultivate 5—6 zile în medii cu făină de soia ca sursă de azot şi amidon ca sursă de carbon, determinîndu-se zilnic activitatea enzimatică.

Purificarea catalazei. Enzima a fost purificată prin precipitări cu sulfat de amoniu şi trecere pe o coloană de Sephadex G-200. În urma purificării s-a obţinut un preparat enzimatic cu o activitate de 14,2 mmoli H_2O_2/min/mg proteină şi un conţinut proteic de 2,4 mg/ml, factorul de purificare fiind 27.

Dozarea activităţii catalazei s-a făcut prin două metode : a) spectrofotometric, după Beers şi Sizer (6) ; b) colorimetric, după Sinha (7).

Imobilizarea catalazei. Membrana de colagen (6 × 6 cm), îmbibată în prealabil cu o soluţie diluată de NaOH, a fost tratată cu carbodiimidă solubilă (EDC) dizolvată în soluţia enzimatică (6 ml). Cuplarea a avut loc timp de 24 de ore la 4—5°C, iar conjugatul enzimatic obţinut a fost spălat de cîteva ori alternativ cu apă distilată şi cu o soluţie de NaCl 0,5 M pînă la îndepărtarea completă a proteinei nelegate. Membrana enzimatică s-a păstrat în apă distilată la rece pînă la folosire.

Determinarea activităţii enzimei imobilizate s-a făcut în aceleaşi condiţii ca şi în cazul enzimei libere, exceptînd faptul că enzima imobilizată a fost îndepărtată din mediul de reacţie după expirarea timpului de acţiune.

Variaţia activităţii catalazei libere şi imobilizate în funcţie de concentraţia substratului s-a determinat folosind H_2O_2 ca substrat în cantităţile 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 × 10^{-6} moli H_2/H_2O_2/ml.

Variaţia activităţii catalazei libere şi imobilizate în funcţie de pH-ul mediului de reacţie a fost determinată efectuîndu-se reacţia enzimatică la următoarele valori de pH : 3, 4, 5, 5 ,6, 6, 6, 6, 7 ,7, 5, 8, 8, 5.

Variaţia activităţii catalazei libere şi imobilizate în funcţie de temperatura mediului de reacţie (a) şi de temperatura de preincubare (b) : a) s-a determinat activitatea enzimei la temperaturile de 10, 25, 35, 45, 55 şi 65°C ; b) preparatele enzimatice au fost preincubate intervale de timp diferite (5, 15, 30, 60 min) la temperaturile de 35 şi 45°C, după care s-a efectuat reacţia enzimatică la temperatura camerei.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin imobilizarea catalazei pe o membrană de colagen s-a obţinut un preparat insolubil cu o activitate de 1,1 mmoli H_2O_2/min/mg proteină şi un conţinut proteic de 0,02 mg proteină/cm^2.

În figura 1 sînt prezentate rezultatele obţinute în urma studiului efectului H_2O_2 asupra activităţii catalazei libere şi imobilizate. După cum se vede din figură, cele două preparate enzimatice de catalază se comportă pînă la un moment dat asemănător, constatîndu-se o creştere a activităţii enzimatice pe măsura creşterii cantităţii de substrat în mediul de reacţie. Menţionăm că, la cantitatea maximă de substrat utilizată, în timp ce activitatea catalazei libere scade (inhibiţie de substrat), cea a enzimei imobilizate continuă să crească.

Urmărind influenţa variaţiilor de pH asupra activităţii catalazei libere şi imobilizate (fig. 2), constatăm o comportare diferită a celor două preparate enzimatice. Astfel, în timp ce enzima liberă prezintă un pH optim de 6,6, cel al enzimei imobilizate se situează la valoarea de 7,0. Deplasarea pH-ului optim de acţiune al catalazei imobilizate spre domeniul alcalin a fost semnalată şi de alţi autori (4), (8), (9). De asemenea se poate constata că prin imobilizare catalaza devine mai rezistentă faţă de variaţiile de pH comparativ cu enzima liberă, în special în domeniul acid. De exemplu, la pH 3,0 enzima imobilizată mai păstrează 56,5% din activitatea maximă, în timp ce enzimei libere îi revin doar 11%.

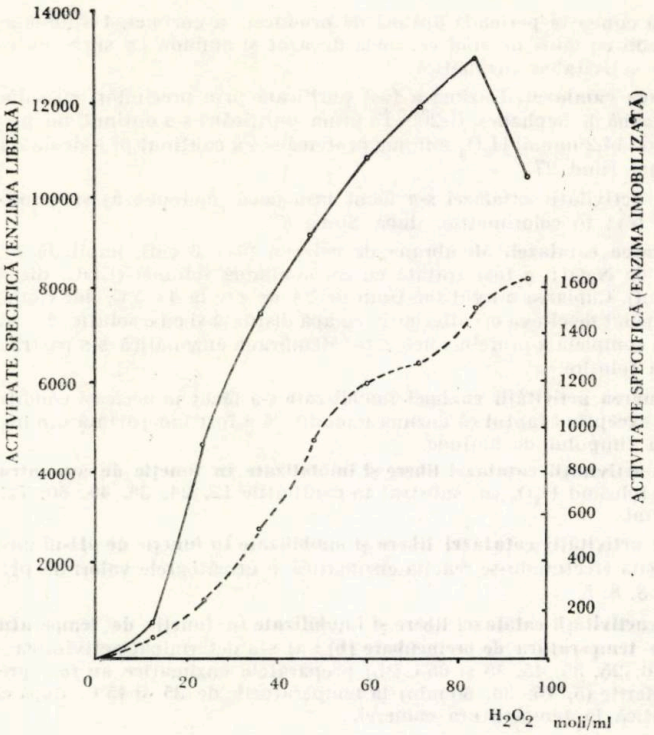


Fig. 1. — Efectul diferitelor cantităţi de H_2O_2 asupra activităţii catalazei libere (——) şi imobilizate (— — —).

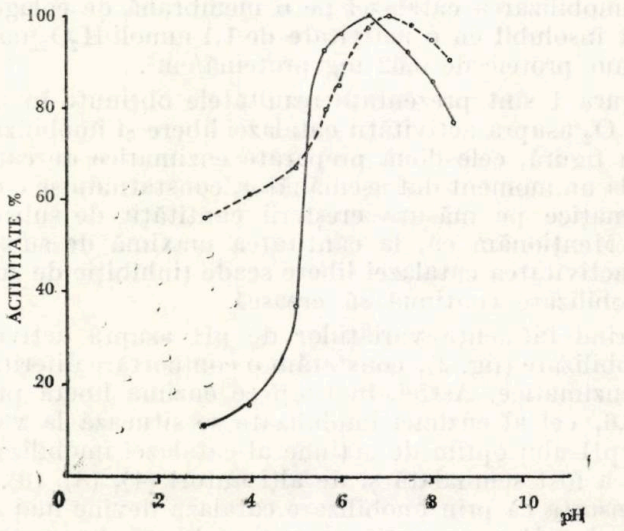


Fig. 2. — Influenţa variaţiilor de pH asupra activităţii catalazei libere (——) şi imobilizate (— — —).

Studiind influența temperaturii asupra activității preparatelor de catalază, se constată o creștere a stabilității preparatului imobilizat față de temperatura mediului de reacție (fig. 3). Astfel, în timp ce enzima liberă are o temperatură optimă situată la 25°C, temperatura optimă de acțiune a catalazei imobilizate este cuprinsă între 35 și 45°C, activitatea enzimatică crescînd cu 9% la aceste temperaturi comparativ cu activitatea

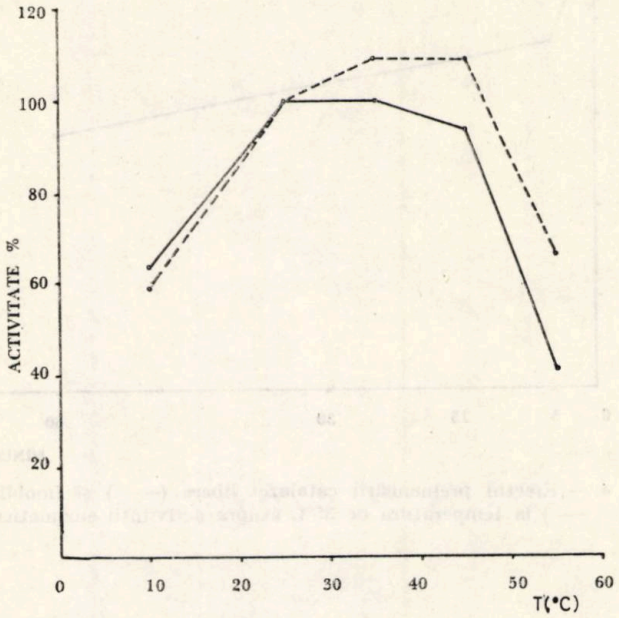


Fig. 3. — Variația activității catalazei libere (——) și imobilizate (— — —) față de temperatura mediului de reacție.

prezentată la 25°C. Rezistența mai crescută a enzimei imobilizate față de variațiile de temperatură este sugestiv ilustrată și de valorile activităților reziduale la 55°C: 66% pentru enzima imobilizată și 41% pentru enzima liberă.

Deoarece enzima liberă este termolabilă, s-au ales ca temperaturi de preincubare valorile de 35 și 45°C (fig. 4 și 5).

Și în acest caz enzima imobilizată se dovedește a fi mai rezistentă comparativ cu cea liberă. Astfel, la 35°C se constată în cazul enzimei libere o scădere bruscă a activității în primele cinci minute, pentru ca apoi scăderea activității enzimatice să fie mai lentă. În acest fel, după 60 min de preincubare, enzima liberă mai păstrează doar 56% din activitatea maximă. În ceea ce privește enzima imobilizată, se constată o creștere treptată a activității enzimatice pe parcursul a 30 min, pentru ca apoi, după 60 min de preincubare, activitatea enzimatică să scadă numai cu 6%. Referitor la temperatura de 45°C, deosebirile de comportament dintre cele două preparate enzimatice sînt mult mai pregnante. Stabilitatea termică a fost urmărită numai pe parcursul a 30 min, dată fiind termolabilitatea accentuată a enzimei libere. Astfel, după 5 min de preincubare,

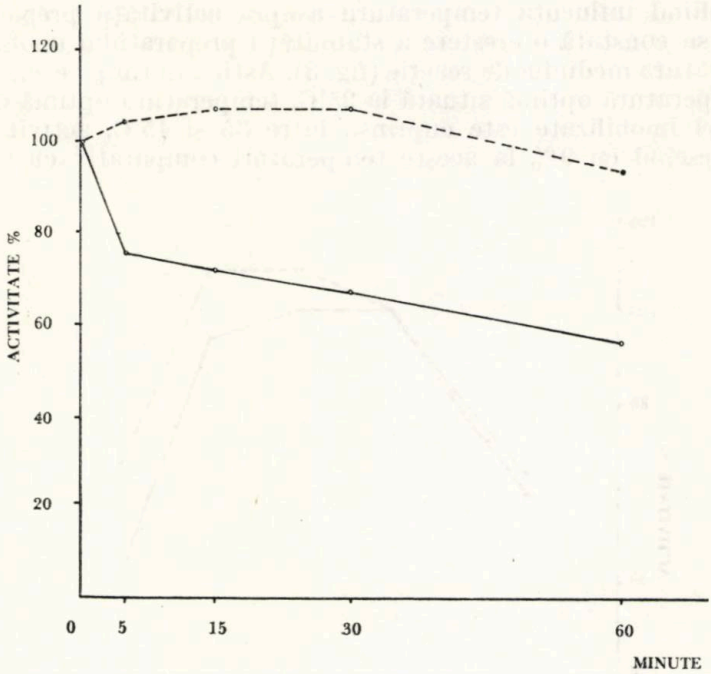


Fig. 4. — Efectul preincubării catalazei libere (——) şi imobilizate (— — —) la temperatura de 35°C asupra activităţii enzimatice.

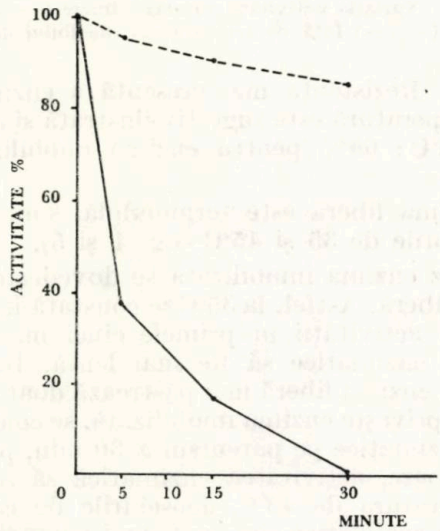


Fig. 5. — Efectul preincubării catalazei libere (——) şi imobilizate (— — —) la temperatura de 45°C asupra activităţii enzimatice.

în timp ce enzima liberă mai păstrează 37% din activitatea maximă, enzimei imobilizate îi revin 95%. La sfîrşitul celor 30 min de preincubare, în timp ce activitatea enzimei libere scade practic la zero, enzima imobilizată mai păstrează în aceste condiţii încă 86% din activitatea maximă. Stabilitatea termică mai crescută a enzimei libere în cazul urmăririi reacţiei la diferite temperaturi, comparativ cu preincubarea ei la aceleaşi temperaturi, s-ar putea explica prin timpul foarte scurt de reacţie (1 min), precum şi prin rolul protector pe care îl poate avea substratul.

Din studiile efectuate asupra catalazeiflibere şi imobilizate s-a putut remarca deci creşterea stabilităţii preparatului imobilizat faţă de denaturarea termică. Acest fenomen se datorează unor aranjamente de natură sterică ce protejează proteina faţă de acţiunea agenţilor denaturanţi.

Preparatul enzimatic imobilizat obţinut prin legarea covalentă a catalazei de o membrană de colagen prezintă stabilitate în timp şi la folosiri repetate. Astfel, după 10 folosiri, activitatea a 1 cm^2 de membrană de colagen pe care s-a imobilizat catalaza scade în medie cu 10%.

CONCLUZII

1. Prin imobilizarea catalazei pe o membrană de colagen s-a obţinut un preparat insolubil cu o activitate de 1,1 mmoli H_2O_2/min/mg proteină şi un conţinut proteic de 0,02 mg proteină/cm^2.
2. În comparaţie cu enzima liberă, cea imobilizată este mai stabilă faţă de concentraţiile mai crescute de substrat.
3. Prin imobilizare, catalaza îşi deplasează pH-ul optim de acţiune spre domeniul alcalin.
4. Preparatul enzimatic imobilizat, comparativ cu cel liber, se dovedeşte a fi mai rezistent faţă de acţiunea denaturantă a agenţilor termici.
5. Enzima imobilizată prezintă stabilitate în timp şi poate fi folosită de mai multe ori fără o diminuare semnificativă a activităţii.

Prezentat la redacţie
la 9 iunie 1984

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

TRÄGERFIXIERUNG DER KATALASE DURCH KOVALENTE BINDUNG AN KOLLAGENMEMBRANE

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Immobilisierung der Katalase aus *Streptomyces* sp. an Kollagenmembrane in Gegenwart von wasserlöslichem Carbodiimid (EDC) wurde ein unlösliches Enzympräparat mit einer Restaktivität von 1,1 mMol H_2O_2/min/mg Protein erhalten. Die trägerfixierte Katalase ist thermostabiler und gegenüber Schwankungen des pH-Wertes sowie gegenüber höheren H_2O_2-Konzentrationen weniger empfindlich als das freie Enzym und kann ohne Aktivitätsverlust wiederholtemale verwendet werden.

BIBLIOGRAFIE

1. R. A. MESSING, Biotechnol. Bioeng., **16**, 1419 (1974).
2. B. DANIELSSON, K. MOSBACH, în *Methods in Enzymology*, vol. XLIV, sub red. K. MOSBACH, Academic Press, New York—San Francisco—London, 1976, p. 671.
3. T. M. S. CHANG, M. POZNANSKI, Nature (London), **218**, 243 (1968).
4. H. D. SCHELL, A. TURCU, MARIA PELE, DOINA POPESCU, Cellulose Chem. Technol., **11**, 331 (1977).
5. SMARANDA DOBROTĂ, VIORICA VELEHORSCHI, VIORICA LAZĂR, Lucrările celui de-al III-lea Simpozion de microbiologie industrială, Bucureşti, 12—13 iunie 1981, p. 113.
6. R. F. BEERS Jr., I. W. SIZER, J. biol. Chem., **195**, 133 (1952).
7. A. K. SINHA, Anal. Biochem., **47**, 389 (1972).
8. H. D. SCHELL, ŞTEFANIA M. TEODOSIU, Rev. roum. Biochim., **19**, 69 (1982).
9. H. D. SCHELL, GABRIELA ANGEL, VIOLETA GOVOREANU, St. cerc. biochim. **26**, 68 (1983).

EFECTUL ANTIBACTERIAN AL UNOR FACTORI ACTIVI DIN COLOSTRU ŞI LAPTE UMAN, ASOCIAŢI ÎN ANUMITE RAPORTURI

VICTORIA HERLEA*, ANCA CIOLAC-RUSSU*, CORINA MIHAIL**, EUGENIA PANDELE**, ELENA ENACHE**

Rezumat. S-a urmărit testarea efectului acţiunii asociate a lizozimului cu sistemul lactoperoxidazic şi a SIgA cu lizozimul, în raporturi diferite, pe bacterii Gram-negative şi Gram-pozitive potenţial patogene. Se constată existenţa unui raport optim al componentelor şi a unei specificităţi de acţiune. În condiţiile experimentale utilizate, efectul inhibant al interacţiunii SIgA/lizozim la un raport de 100/1 se manifestă pe *Staphylococcus aureus*, iar combinaţia lactoperoxidază/lizozim are un efect bactericid pe *S. aureus* şi *Proteus* sp. în raport de 1/100.

Prezenţa unor factori activi cu acţiune antimicrobiană specifică şi nespecifică conferă laptelui şi colostrului uman proprietăţi care pot fi exploatate prin utilizarea în terapia unor infecţii ale mucoaselor a factorilor izolaţi şi purificaţi sub formă de preparate.

Testarea in vitro a calităţilor laptelui şi colostrului ca atare sau a lactoperoxidazei, lizozimului, lactoferinei, imunoglobulinei A secretoare conţinute de acestea evidenţiază efectul antibacterian şi antifungic selectiv, precum şi anumite condiţii experimentale de care depinde acest efect (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12). Asocierea in vitro a lizozimului cu sistemul lactoperoxidazic conduce la efecte antimicrobiene potenţate pe un spectru lărgit de tulpini bacteriene (atît Gram-pozitive cît şi Gram-negative), dintre care unele nu sînt susceptibile la acţiunea factorilor separaţi. Se ştie de asemenea că activitatea de anticorp a SIgA implică participarea contestată a lizozimului (13). Unele rezultate obţinute în cercetări anterioare relevă efectul inhibant al asocierii SIgA cu lizozimul, manifestat prin potenţarea activităţii aglutinante sau prin intensificarea activităţii litice. Este de aşteptat ca interacţiunea dintre componentele izolate şi purificate din lapte uman să se manifeste eficient în cazul unui raport optim şi selectiv pe diferite tulpini de microorganisme. Stabilirea unor raporturi optime în asocierea componentelor şi a specificităţii lor de acţiune este semnificativă în realizarea compoziţiei adecvate a preparatelor din lapte uman îmbogăţite în vederea utilizării lor în clinică. În acest scop am realizat testarea efectului acţiunii asociate a lizozimului cu sistemul lactoperoxidazic în raporturi diferite şi a efectului selectiv inhibant al interacţiunii SIgA cu lizozimul la un raport de 10/1 pe mai multe tulpini microbiene.

St. cerc. biochim., 27, 2, 133–137 (1984)

MATERIAL ŞI METODE

Tulpini bacteriene. Tulpina *Proteus* sp. utilizată în experiment a fost iniţial izolată de la un bolnav în laboratorul de bacteriologie al Centrului de fono-audiologie din Bucureşti şi caracterizată ca rezistentă la antibiotice. Tulpinile *Escherichia coli* O_{128} B_{12}, *Proteus mirabilis* RO 25 şi *Staphylococcus aureus* Oxford 10279 au fost furnizate de laboratorul de bacteriologie al Institutului de igienă şi sănătate publică din Bucureşti. Culturile stoc au fost menţinute pe mediul de întreţinere după formula OMS modificată. Pentru analizele în vitro au fost obţinute culturi proaspete prin trecere pe geloză nutritivă (Institutul „Dr. I. Cantacuzino") înclinată şi prin incubare la 37°C. Înaintea testărilor se controlează puritatea culturilor.

Factorii activi testaţi pentru activitate antimicrobiană, în asociere în raporturi diferite, avînd anumite caracteristici, au fost obţinuţi în laboratorul de imunochimie din ICEBIOL. Lactoperoxidaza (LPO) umană, sub formă de soluţie cu pH 7,0, are activitatea specifică = 175 u/mgP/25°C şi concentraţia proteică =200 μg/ml. LPO se adaugă în sistemul LPO— SCN^-— H_2O_2($_S$LPO), care are următoarele concentraţii ale componentelor, stabilite prin cercetări anterioare (14) : 1 μmol/ml H_2O_2 + 2 μmoli/ml KSCN + 10 μg/ml LPO. SIgA se prezintă sub forma unei soluţii cu o concentraţie proteică de 6 mg/ml, iar lizozimul (LZ) sub formă de liofilizat cu activitatea litică=70 μg/ml şi concentraţia proteică = 0,35 mg/ml (5 mg liofilizat asigură în probă o activitate litică de 70 μg/ml).

Testarea efectului antimicrobian s-a făcut după metoda recomandată de Duval şi Soussy (15) pentru studiul în mediu lichid al puterii bactericide a antibioticelor, adaptată şi utilizată în cercetări anterioare (16). Conform metodei, se apreciază procentul de germeni supravieţuitori după un contact de 24 de ore cu factorul sau factorii asociaţi (fig. 1).

Probele — în număr de 11 pentru fiecare tulpină bacteriană testată — sînt analizate în comparaţie cu martorii şi conţin în volum ¡final fix de reacţie următoarele componente:

1 = M (martor pentru probele 2—5) : 0,1 ml inocul + 0,2 ml soluţie salină fiziologică (A.F.)
2 = 0,1 ml inocul +0,1 ml $_S$LPO (0,01 ml H_2O_2 dintr-o soluţie 1/100 H_2O_2 30% + 0,01 ml KSCN dintr-o soluţie de 5 ml apă distilată cu 5 mg KSCN p.a. + 0,08 ml LPO) + 2 mg LZ + 0,1 ml A.F.
3 = 0,1 ml inocul + 0,1 ml LPO + 2 mg LZ + 0,1 ml A.F.
4 = 0,1 ml inocul + 0,1 ml $_S$LPO + 4 mg LZ + 0,1 ml A.F.
5 = 0,1 ml inocul + 0,1 ml LPO + 4 mg LZ + 0,1 ml A.F.
6 = 0,1 ml inocul + 1 ml SIgA (6 mg/ml)
7 = 0,1 ml inocul + 1 ml SIgA (0,6 mg/ml)
8 = 0,1 ml inocul + 1 ml A.F. + 5 mg LZ (70 μg/ml)
9 = 0,1 ml inocul + 1 ml SIgA (6 mg/ml) + 5 mg LZ
10 = 0,1 ml inocul + 1 ml SIgA (0,6 mg/ml) + 5 mg LZ
11 = M (martor pentru probele 6—10) : 0,1 ml inocul + 1 ml bulion

Sînt incluse probele 3 şi 5 pentru a testa comparativ eventualul efect inhibitor al LPO singure (nu în sistem), constatat în unele experimente preliminare. În cadrul ultimelor şase probe, proba 10 asigură raportul dintre SIgA şi LZ de aproximativ 10/1, celelalte probe constituind martori de verificare pentru acest raport şi pentru efectul inhibant prin interacţiunea SIgA/LZ.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute în condiţiile experimentale menţionate, apreciate prin analiza comparativă a striurilor de însămînţare din probe faţă de striurile plăcilor martor, se concretizează în următoarele date:

Pe *Proteus* sp., LPO ca atare în asociaţie cu LZ (fie 2 mg, fie 4 mg) nu are efect antimicrobian decelabil prin metoda utilizată (probele 3 şi 5). În schimb, atît în proba 2 cît şi în proba 4, LPO în $_S$LPO şi asociată cu 2 mg LZ (proba 2) sau cu 4 mg LZ (proba 4) determină o acţiune net bactericidă. Efectul bactericid, respectiv absenţa aparentă a oricărui supravieţuitor, este apreciat în termenii tehnicii de lucru utilizate ca procent de supravieţuitori inferior celui de 0,01%. În comparaţie cu rezultatele obţinute pe *Proteus* sp., pe *S. aureus* se constată aceleaşi efecte; în plus, în cazul probei 5 (LPO + 4 mg LZ) apare un efect bacteriostatic.

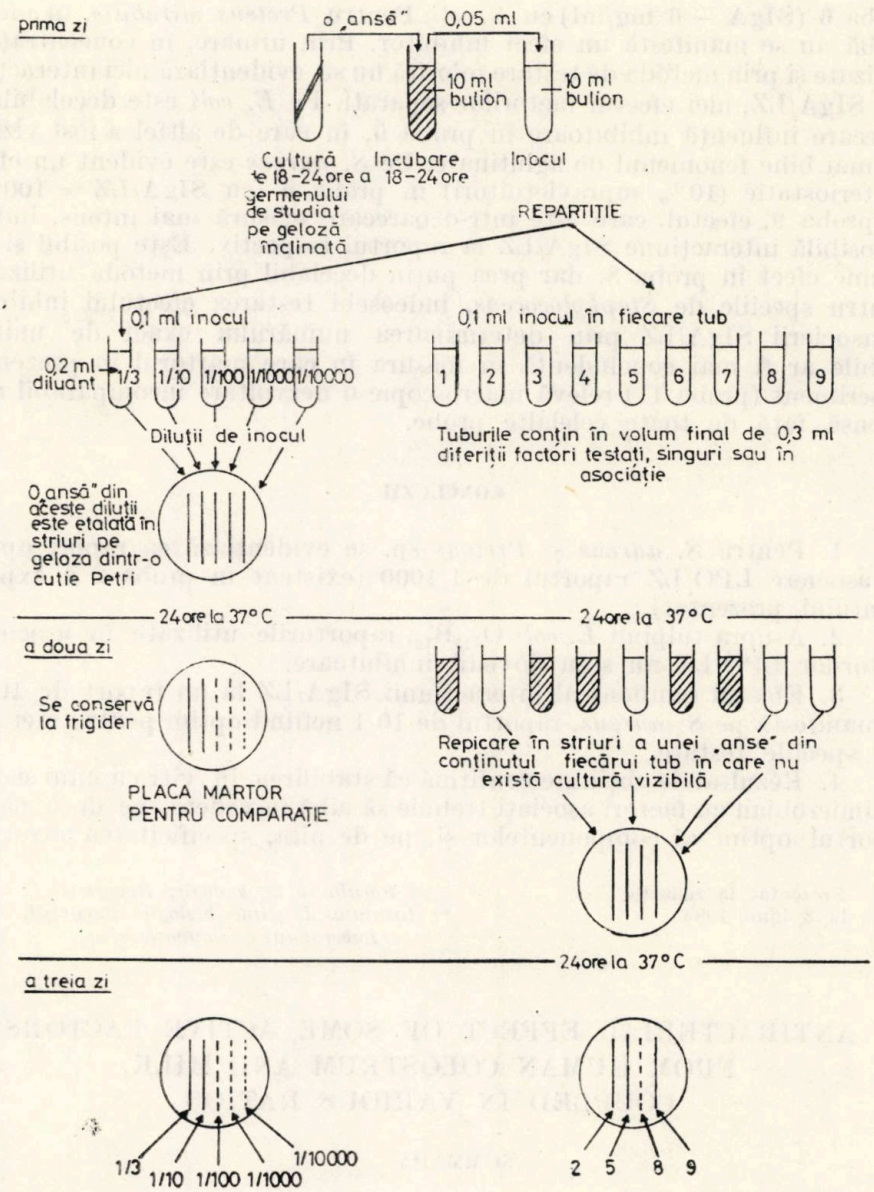

prima zi
o „ansă"
0,05 ml
10 ml bulion
10 ml bulion
Cultură de 18-24 ore a germenului de studiat pe geloză înclinată
Incubare 18-24 ore
Inocul
REPARTIŢIE
0,1 ml inocul
0,2 ml diluant
1/3 1/10 1/100 1/1000 1/10000
Diluţii de inocul
„Ansă" din aceste diluţii este etalată în striuri pe geloza dintr-o cutie Petri
0,1 ml inocul în fiecare tub
1 2 3 4 5 6 7 8 9
Tuburile conţin în volum final de 0,3 ml diferiţii factori testaţi, singuri sau în asociaţie
24 ore la 37°C
24 ore la 37°C
a doua zi
Se conservă la frigider
PLACA MARTOR PENTRU COMPARAŢIE
Repicare în striuri a unei „anse" din conţinutul fiecărui tub în care nu există cultură vizibilă
24 ore la 37°C
a treia zi
1/3 1/10 1/100 1/1000 1/10000
2 5 8 9

Fig. 1. — Metoda de studiu în mediu lichid al efectului bactericid al factorilor activi, separat sau în asociaţie (16).

Introducînd martori suplimentari, prin repetarea experimentului pe *S. aureus* se constată că nici $_{S}$LPO singur şi nici LZ singur (2 mg în probă) nu au efect inhibitor. Prin asociere (în proba 2) se realizează o potenţare, tradusă prin efect bactericid.

Examinarea macroscopică a probelor 6—10 după 24 de ore de incubare la termostat (37°C) relevă un efect de aglutinare vizibil în special în

proba 6 (SIgA — 6 mg/ml) cu *E. coli*. Pentru *Proteus mirabilis*, în nici o probă nu se manifestă un efect inhibitor. Prin urmare, în concentraţiile utilizate şi prin metoda de testare folosită nu se evidenţiază nici interacţiunea SIgA/LZ, nici efectul factorilor separaţi. Pe *E. coli* este decelabilă o oarecare influenţă inhibitoare în proba 6, în care de altfel a fost vizibil cel mai bine fenomenul de aglutinare. Pe *S. aureus* este evident un efect bacteriostatic (10% supravieţuitori) în proba 6 (cu SIgA/LZ = 100/1). În proba 9, efectul, care este într-o oarecare măsură mai intens, indică o posibilă interacţiune SIgA/LZ la raportul respectiv. Este posibil şi un anume efect în proba 8, dar prea puţin decelabil prin metoda utilizată. Pentru speciile de *Staphylococcus*, îndeosebi testarea efectului inhibant al asocierii SIgA/LZ prin determinarea numărului exact de unităţi viabile ar fi mai concludentă în măsura în care martorul în prezentul experiment (proba 11) relevă macroscopic o dezvoltare incomparabil mai intensă faţă de toate celelalte probe.

CONCLUZII

1. Pentru *S. aureus* şi *Proteus* sp. se evidenţiază ca raport optim de asociere LPO/LZ raportul de 1/1000 (existent în proba 2 a experimentului prezentat).

2. Asupra tulpinii *E. coli* $O_{128}B_{12}$, raporturile utilizate în asocierea factorilor LPO/LZ nu s-au dovedit inhibitoare.

3. Efectul inhibant al interacţiunii SIgA/LZ la un raport de 100/1 se manifestă pe *S. aureus*, raportul de 10/1 nefiind optim pentru nici una din speciile testate.

4. Rezultatele obţinute confirmă că stabilirea in vitro a unui sistem antimicrobian cu factori asociaţi trebuie să aibă în vedere, pe de o parte, raportul optim al componentelor şi, pe de alta, specificitatea acestuia.

Prezentat la redacţie
la 8 iunie 1984

* *Facultatea de biologie, Bucureşti*
** *Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti, Laboratorul de imunochimie*

ANTIBACTERIAL EFFECT OF SOME ACTIVE FACTORS FROM HUMAN COLOSTRUM AND MILK, COUPLED IN VARIOUS RATIOS

SUMMARY

The action of lysozyme coupled with lactoperoxidase and of secretory IgA coupled with lysozyme, in various ratios, on potentially pathogenic gram-negative and gram-positive bacteria was investigated. There is an optimal ratio between the various milk components and a specificty of action that should be taken into account in order to get the best responses. It has been found that the system SIgA-lysozyme (100 : 1, w/w) has an inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*, whereas the system lactoperoxidase-lysozyme (1 : 1000, w/w) exhibitis a bactericidal effect against *S. aureus* and *Proteus* sp.

BIBLIOGRAFIE

1. R. R. ARNOLD, M. BRENER, J. J. GAUTHIER, Infect. Immun., **28**, 893 (1980).
2. R. R. ARNOLD, J. B. RUSSEL, W. J. CHAMPION, J. J. GAUTHIER, Infect. Immun., **32**, 655 (1981).
3. C. V. BUKHARIN, B. YA. USVIATSOV, V. I. ZHELTOVA, L. G. BOLDYREVA, Antibiotiki, **23**, 997 (1978).
4. E. GRIFFITH, J. HUMPHREYS, Infect. Immun., **15**, 396 (1977).
5. P. JOLLES, J. JOLLES, Nature, **192**, 1187 (1961).
6. C. H. KIRKPATRICK, IRA GREEN, R. R. RICK, A. L. SCHADE, J. infect. Dis., **124**, 6 (1971).
7. M. N. MICKELSON, Appl. Environ. Microbiol., **38**, 821 (1979).
8. K. M. FRUITT, M. ADAMSON, R. R. ARNOLD, Infect. Immun., **25**, 304 (1979).
9. B. REITER, V. M. E. MARSHALL, L. BJORCK, C. G. ROSEN, Infect. Immun., **13**, 800 (1976).
10. B. REITER, J. D. ORAM, Nature, **216**, 328 (1967).
11. B. REITER, A. PICKERING, J. D. ORAM, J. S. POPE, J. gen. Microbiol., **33**, XII (1963).
12. F. R. SAMSON, C. MIRTLE, D. B. L. McCLELLAND, Immunology, **38**, 367 (1979).
13. I. R. HILL, P. PORTER, Immunology, **26**, 1239 (1974).
14. VICTORIA HERLEA, Ann. Univ. Buc., Biologie, **XXXII**, 71 (1983).
15. J. DUVAL, C. J. SOUSSY, *Agrégé d'antibiothérapie. Bases bactériologiques pour l'utilisation des antibiotiques*, Masson, Paris, 1980, p. 33—45.
16. VICTORIA HERLEA, Rev. roum. Biol., Série Biol. végét., **28**, 145 (1983).

INTERACȚIUNEA LECTINELOR CU ENZIMELE. I. EFECTUL LECTINEI DIN *PISUM SATIVUM* ASUPRA IZOPEROXIDAZELOR DIN HREAN ȘI LACTOPEROXIDAZEI DIN COLOSTRU DE VACĂ

ȘTEFAN A. HULEA, ȘTEFANA MOGOȘ, JUNONA COLCEAG, FLORINA GROZA

Rezumat. S-a studiat acțiunea unei lectine specifice pentru manoză/glucoză extrase din semințele de *Pisum sativum* asupra activității izoperoxidazelor din hrean și lactoperoxidazei din colostru de vacă. Rezultatele au arătat un efect inhibitor al lectinei asupra izoperoxidazelor A și C din hrean, însă cinetica inhibiției a fost diferită pentru cele două izoenzime. Pe de altă parte, incubarea lactoperoxidazei cu lectina conduce la o ușoară creștere a activității enzimatice.

Interesul cercetătorilor pentru lectine a crescut mult în ultimele două decenii datorită posibilităților pe care aceste substanțe le oferă pentru studiul membranelor celulare. Lectinele și-au găsit largi aplicații în fracționarea glicoproteinelor cu și fără activitate enzimatică, în studiul receptorilor de membrană, în separarea diferitelor tipuri de celule, în investigarea microheterogeneității proteinelor plasmatice etc.

În ceea ce privește interacțiunea dintre lectine și enzime, există încă relativ puține informații. Se cunosc deja enzime de origine animală, și anume hidrolaze acide (1), (2), (3), sau vegetală (4), (5), (6) care interacționează cu lectinele. Referitor la enzimele din plante s-a arătat că interacțiunea dintre enzimă și lectină poate duce fie la activarea (4) sau la inhibiția activității enzimatice (5), fie la lipsa unui răspuns din partea enzimei (6). Interacțiunea dintre lectine și peroxidază a fost pentru prima oară semnalată în cazul izolării concanavalinei prin cromatografie de afinitate pe coloană de peroxidază imobilizată (7) și, invers, în cazul purificării peroxidazei din hrean prin cromatografie pe Con A-Sepharose (8).

Luînd în considerare participarea peroxidazei într-o serie de procese metabolice importante, am apreciat ca oportună studierea posibilelor interacțiuni dintre peroxidază și lectine. Am ales lectina din mazăre întrucît ea prezintă specificitate pentru manoză/glucoză, iar peroxidazele din hrean conțin în molecula lor resturi de manoză (9). În lucrarea de față am cercetat efectul lectinei purificate din *Pisum sativum* asupra afinității peroxidazelor de origini diferite față de apa oxigenată în prezența sau în absența lectinei.

MATERIALE ȘI METODE

Semințele de *Pisum sativum* au fost procurate de la Grădina botanică din București, iar colostrul de vacă a provenit de la I.A.S. Popești-Leordeni.

Sephadex G-100 a fost procurat de la Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Amberlit CG 50 a fost obținut de la Serva, iar CM-celuloza de la Whatman. Restul reactivilor au fost

de puritate analitică și obținuți din surse comerciale. Determinările cinetice au fost efectuate cu ajutorul unui spectrofotometru Pye Unicam SP 1800, dotat cu înregistrare și termostatare.

Purificarea peroxidazei din hrean s-a facut conform schemei descrise de Shannon și colab. (9). Lactoperoxidaza din colostru de vacă a fost purificată după metoda lui Morrisson și Hultquist (10). Lectina a fost purificată din semințe de *Pisum sativum*, ținînd seama de indicațiile date de van Driessche și colab. (11).

Activitatea peroxidazică s-a determinat prin metoda spectrofotometrică, folosind hidrochinona ca donor de hidrogen pentru peroxidaza din hrean și pirogalolul pentru lactoperoxidază. Activitatea enzimatică s-a exprimat în unități de absorbție și s-a calculat din porțiunea lineară a curbei. Efectul lectinei asupra peroxidazelor a fost urmărit prin incubarea acesteia cu enzima în cuva spectrofotometrului timp de 10 min la 25°C, după care s-au adăugat donorul de hidrogen și apa oxigenată pentru inițierea reacției enzimatice. Concentrația proteică s-a estimat prin metoda Lowry. Concentrația purității izoperoxidazelor separate prin cromatografie de schimb ionic s-a făcut prin electroforeza în gel de poliacrilamidă în sistem continuu, în tampon Tris-glicocol, pH 8,3.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Urmărind schema de purificare a peroxidazei din hrean, propusă de Shannon, am obținut izoenzimele A, B și C. Izoenzima A s-a dovedit a fi electroforetic pură, iar izoenzima C prezintă slabe urme din izoenzima B. Izoperoxidazele B și C diferă de izoperoxidaza A prin compoziția

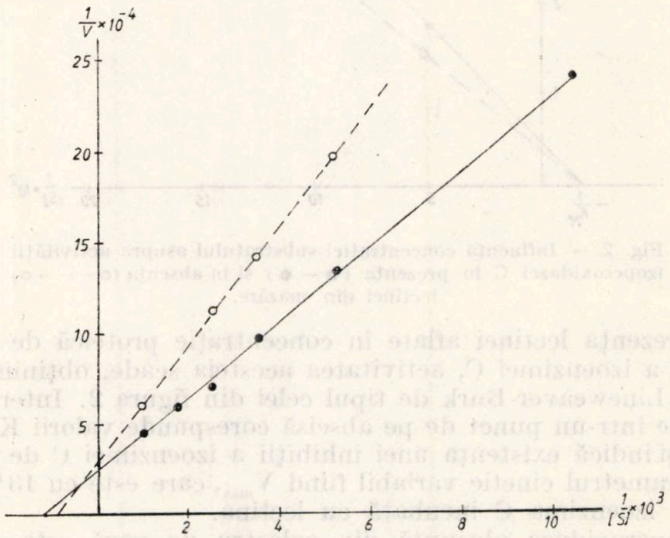


Fig. 1. — Influența concentrației substratului asupra activității izoperoxidazei A în prezența (● — ●) și în absența (o— — —o) lectinei din mazăre.

în aminoacizi și prin structura părții glucidice. În acest studiu am luat în considerare numai izoperoxidazele A și C.

Prin incubarea izoenzimei A cu lectina în proporție de 1 : 2, activitatea enzimei scade, variind în funcție de concentrația substratului după o curbă de tip Michaelis-Menten. Din reprezentarea grafică Lineweaver-Burk (fig. 1) rezultă valori diferite ale K_m și V_{max} pentru izoperoxidaza A

în prezenţa şi în absenţa lectinei. Valoarea V_{max} este cu 20% mai scăzută pentru izoenzima A incubată cu lectina, iar K_m creşte de la $0{,}8 \times 10^{-3}$ M, în absenţa lectinei, la $1{,}1 \times 10^{-3}$ M, în prezenţa lectinei. După cum se vede din figura 1, inhibiţia obţinută prin acţiunea lectinei asupra izoperoxidazei A este de tip mixt : viteza de reacţie scade, modificîndu-se şi afinitatea enzimei faţă de substrat, deşi nu există o competiţie între lectină şi apa oxigenată.

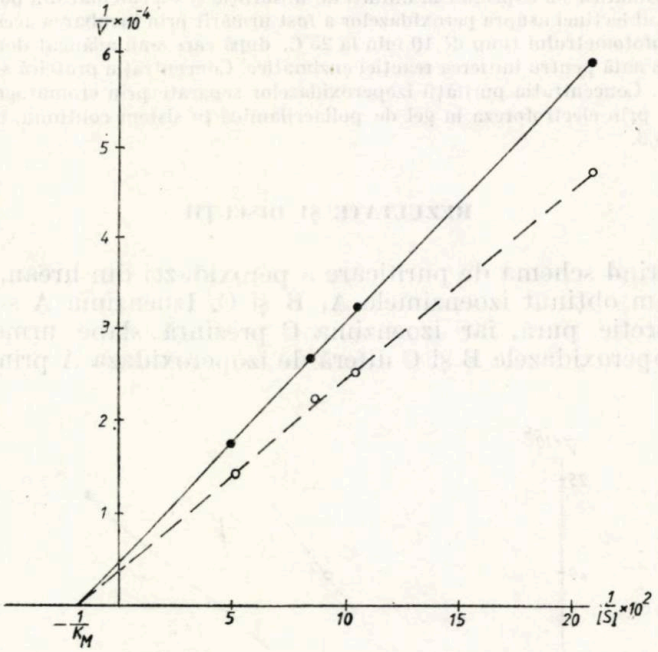


Fig. 2. — Influenţa concentraţiei substratului asupra activităţii izoperoxidazei C în prezenţa (● — ●) şi în absenţa (o— — —o) lectinei din mazăre.

În prezenţa lectinei aflate în concentraţie proteică de 10 ori mai mare decît a izoenzimei C, activitatea acesteia scade, obţinîndu-se o reprezentare Lineweaver-Burk de tipul celei din figura 2. Intersecţia celor două drepte într-un punct de pe abscisă corespunde valorii K_m de $5{,}5 \times \times 10^{-3}$ M şi indică existenţa unei inhibiţii a izoenzimei C de tip necompetitiv, parametrul cinetic variabil fiind V_{max}, care este cu 13% mai scăzut pentru izoenzima C incubată cu lectina.

Lactoperoxidaza obţinută din colostru de vacă este activată în prezenţa lectinei (raportul enzimă/lectină fiind 10 : 1), înregistrîndu-se o creştere în activitate de 12%; valoarea K_m rămîne nemodificată ($7{,}14 \times \times 10^{-5}$ M)(fig. 3).

Datele cinetice obţinute prin incubarea peroxidazelor cu lectina purificată din mazăre indică existenţa unei interacţiuni evidente între lectină şi enzime. În literatură se cunosc deja cîteva studii asupra interacţiunilor dintre lectine şi enzime. Astfel, prin incubarea fosfatazei alcaline şi a fosfodiesterazei (6) cu lectine nu se înregistrează nici o schimbare în activitatea enzimelor. În alte cazuri însă, de exemplu pentru fosfataza

acidă (1) și aril-sulfatază (5), formarea complexului enzimă—Con A reduce afinitatea enzimei pentru substrat, iar Lorenc-Kubis și Beg-Hansen (4) constată o activare a fosfatazei acide din *Poa pratensis* prin legare cu Con A.

Rezultatele noastre arată că, prin incubarea izoperoxidazelor din hrean cu lectina specifică pentru manoză/glucoză din seminţele de mazăre, se obţine o inhibiţie a acestora. Diferenţele constatate în cinetica celor două enzime în prezenţa lectinei s-ar putea datora interacţiunilor de tip

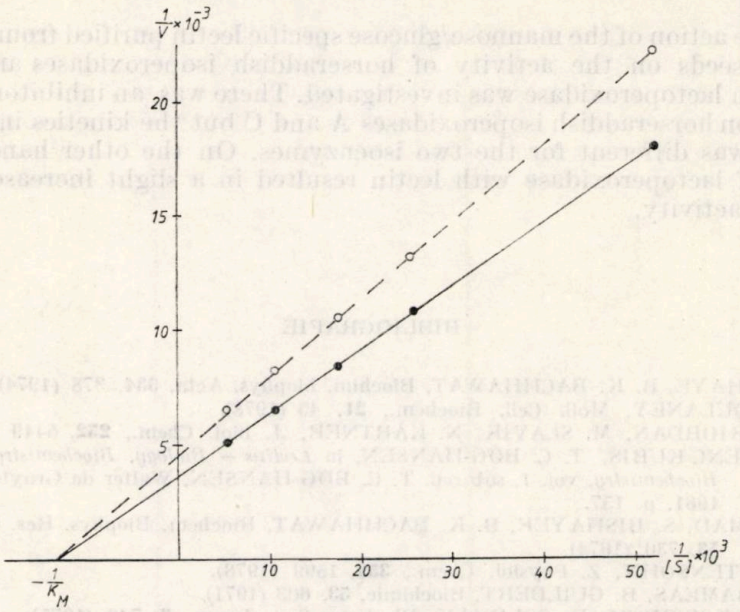


Fig. 3. — Influenţa concentraţiei substratului asupra activităţii lactoperoxidazei în prezenţa (● — ●) şi în absenţa (o— — —o) lectinei din mazăre.

hidrofob dintre lectină şi partea glucidică a celor două izoperoxidaze, precum şi interacţiunilor implicînd legături de hidrogen şi forţe electrostatice dintre lectină şi lanţurile de aminoacizi ale izoperoxidazelor. În funcţie de legăturile care se formează cu lectina, este posibilă inducerea unor modificări sterice în conformaţia centrului activ al izoperoxidazelor, care să ducă la efectele observate.

Spre deosebire de efectul inhibitor al lectinei din mazăre asupra izoperoxidazelor din hrean, constatăm o uşoară activare a lactoperoxidazei. Numai pe baza datelor obţinute în acest studiu nu avem posibilitatea de a explica satisfăcător mecanismul inhibiţiei, şi respectiv, al activării celor două tipuri de peroxidaze. Rezultatele acestui studiu, împreună cu alte cercetări mai aprofundate, ar putea duce la obţinerea de informaţii suplimentare cu privire la structura şi mecanismul de acţiune al peroxidazelor, dar şi la existenţa unor sisteme de reglare la nivel celular datorate interacţiunii lectinelor cu enzimele.

Prezentat la redacţie
la 12 iunie 1984

Institutul de ştiinţe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

INTERACTION OF LECTINS WITH THE ENZYMES. I. THE EFFECT OF *PISUM SATIVUM* LECTIN ON HORSERADDISH ISOPEROXIDASES AND COW'S COLOSTRUM LACTOPEROXIDASE ACTIVITY

SUMMARY

The action of the mannose/glucose specific lectin purified from *Pisum sativum* seeds on the activity of horseraddish isoperoxidases and cow's colostrum lactoperoxidase was investigated. There was an inhibitory effect of lectin on horseraddish isoperoxidases A and C but the kinetics inhibition pattern was different for the two isoenzymes. On the other hand, incubation of lactoperoxidase with lectin resulted in a slight increase of the enzyme activity.

BIBLIOGRAFIE

1. S. BISHAYE, B. K. BACHHAWAT, Biochim. biophys. Acta, **334**, 378 (1974).
2. J. T. DULANEY, Moll. Cell. Biochem., **21**, 43 (1978).
3. J. R. RIORDAN, M. SLAVIK, N. KARTNER, J. biol. Chem., **252**, 5449 (1977).
4. I. LORENC-KUBIS, T. C. BØG-HANSEN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin, 1981, p. 157.
5. A. AHMAD, S. BISHAYEE, B. K. BACHHAWAT, Biochem. Biophys. Res. Commun., **53**, 730 (1974).
6. W. GUTENSOHN, Z. Physiol. Chem., **359**, 1599 (1978).
7. S. AVRAMEAS, B. GUILBERT, Biochimie, **53**, 603 (1971).
8. G. HOLDSWORTH, R. COLEMAN, Biochem. Soc. Trans., **3**, 746 (1975).
9. L. M. SHANNON, F. KAY, J. J. LEW, J. biol. Chem., **241**, 2166 (1966).
10. M. MORRISSON, D. E. HULTQUIST, J. biol. Chem., **238**, 2847 (1963).
11. E. van DRIESSCHE, G. SMETS, R. DEJOEGERE, L. KANAREK, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T.C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin, 1981, p. 729.

CERCETĂRI BIOCHIMICE ASUPRA CAROTENOIDELOR DIN PORUMB. III. CONȚINUTUL CAROTENOIDELOR ȘI AL AZOTULUI TOTAL DIN BOABELE UNOR HIBRIZI DE PORUMB DIPLOID

G. NEAMȚU*, I. CĂBULEA**, AUGUSTA LUJERDEAN*, FL. IRIMIE***

Rezumat. S-a efectuat un studiu al pigmenților carotenoidici și al azotului total din 45 de hibrizi de porumb normal diploid, cultivați pe același tip de sol, pe trei loturi comparative (A_1, A_2, A_3), pe care s-au aplicat cantități diferite de N, sub formă de NH_4NO_3.

S-a urmărit stabilirea unei corelații între natura și conținutul carotenoidelor, azotul total din boabele de porumb și doza de azot aplicată la hectar. Datele experimentale arată existența unei relații invers proporționale între conținutul mediu al carotenoidelor din aceiași hibrizi cultivați pe trei loturi comparative (32,43 μg/g A_1, 29,82 μg/g A_2 și 27,54 μg/g A_3) și mărimea dozei de N aplicate la hectar (90, 180 și, respectiv, 270 kg/ha). Conținutul mediu de N total din boabele de porumb (2,19% A_1, 2,30% A_2 și 2,37% A_3) crește cu cantitatea de N aplicată la hectar. Azotatul de amoniu nu influențează natura carotenoidelor, ci numai cantitatea acestora.

Pigmenții carotenoidici constituie indici calitativi importanți ai boabelor de porumb (1), (2), (3), (4). Ei determină culoarea boabelor și constituie unica sursă din care omul și animalele își sintetizează vitamina A. Carotenoidele influențează pozitiv creșterea organismelor animale, refacerea țesuturilor epiteliale, iau parte la formarea pigmenților fotosensibili implicați în procesul vederii. De asemenea reduc sterilitatea la animale, protejează numeroase substanțe biologic active de degradări oxidative, iau parte la numeroase procese biologice din organism, constituie materia primă din care se sintetizează numeroase substanțe biologic active (fitohormoni, retinoide etc.) (5), (6), (7).

Dintre pigmenții carotenoidici existenți în boabele de porumb, valoare biologică mai importantă au carotenoidele provitaminice, fapt pentru care în ultimii ani s-au intensificat cercetările în țara noastră pentru obținerea unor forme noi de porumb, cu conținut ridicat de carotenoide provitaminice, calitativ superioare formelor actuale (8), (9), (10), (11), (12). Pentru obținerea unor noi hibrizi de porumb, cu conținut ridicat atît în carotenoide provitaminice, cît și în azot, amidon și grăsimi, s-a cercetat pentru început corelația care există între conținutul carotenoidelor și al azotului total din boabele de porumb și cantitatea de îngrășăminte azotate date la hectar.

În această lucrare se prezintă conținutul pigmenților carotenoidici și al azotului total din boabele a 45 de hibrizi de porumb normal diploid, cultivați fiecare pe trei loturi comparative, pe care s-au folosit cantități diferite de azotat de amoniu.

St. cerc. biochim, 27, 2, 143–148 (1984)

MATERIAL ȘI METODE

Materialul biologic s-a obținut la S.C.A. Turda de către un colectiv de cercetători condus de ing. dr. Iancu Căbulea. S-au cercetat carotenoidele și azotul total din boabele a 45 de hibrizi de porumb normal diploid, care au fost cultivați pe trei loturi diferite, dar pe același tip de sol, pe care s-au administrat cantități diferite de azotat de amoniu, exprimat în substanță activă, după cum urmează : 90 kg s.a. /ha pe lotul A_1, 180 kg s.a./ha pe lotul A_2 și 270 kg s.a./ha pe lotul A_3.

Materialul pentru analiză s-a obținut din producția anului 1982 și a constat din 135 probe (45 × 3). Analizele s-au efectuat cu material uscat, bine păstrat, în cursul anului 1983.

Pentru extragerea carotenoidelor, boabele de porumb s-au măcinat, iar făina proaspăt obținută s-a umectat cu apă și s-a tratat apoi cu un amestec de eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 6 : 3 : 1, pînă ce extractul a rămas incolor. Extractul primar astfel obținut s-a spălat cu apă de 14—16 ori, pentru îndepărtarea acetonei și a metanolului, iar stratul eteric, care conține pigmenți, a fost trecut peste un strat de Na_2SO_4 anhidru, pentru reținerea urmelor de apă.

Separarea și purificarea carotenoidelor s-au făcut pe coloană cromatografică, utilizîndu-se ca adsorbant un amestec de oxid de magneziu și nisip fin, în raport de 2 : 1 în greutate. Pentru developarea coloanelor s-a folosit un amestec de eter de petrol și acetonă, a cărui concentrație a crescut pînă la 20%, în funcție de tasarea materialului adsorbant.

Separarea și dozarea carotenoidelor din boabele de porumb s-au efectuat pe tipuri de carotenoide, după cum urmează : carotenoide hidrocarburice (α-caroten, β-caroten, β-zeacaroten), criptoxantine (α- și β-criptoxantina, care sînt monoxantofile), luteină (dixantofilă cu structură α), zeaxantină (dixantofilă cu structură β), carotenoide epoxidice (violaxantină, anteraxantină, auroxantină, eloxantină, flavoxantină). Conținutul carotenoidelor provitaminice s-a stabilit prin însumarea conținutului carotenoidelor hidrocarburice cu cel al criptoxantinelor, iar conținutul carotenoidelor totale prin însumarea conținutului tuturor fracțiunilor, și nu prin dozarea extractului primar, deoarece aceșta conține și alți compuși, care îngreuiază dozarea carotenoidelor.

Identificarea și dozarea carotenoidelor s-au făcut prin metode cromatografice și spectrofotometrice, la fel ca și în lucrările anterioare (8), (9), (10).

Pentru dozarea azotului total s-au folosit cîte 0,2 grame de făină, proaspăt obținută, care s-a mineralizat pe cale umedă, iar azotul s-a dozat după metoda Kjeldahl (13).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din cercetările efectuate reiese că toți hibrizii de porumb analizați conțin în boabe aceleași carotenoide. Deosebirile dintre carotenoidele existente în boabele celor 45 de hibrizi de porumb cultivați pe același lot, precum și cele existente la același hibrid cultivat pe cele trei loturi comparative sînt de ordin cantitativ, dar nu și calitativ. Azotatul de amoniu nu influențează natura carotenoidelor, ci numai cantitatea acestora.

În toate probele cercetate, pigmenții principali sînt zeaxantina și luteina, al căror conținut influențează substanțial culoarea boabelor (zeaxantina este portocalie, iar luteina galbenă), după care, în general, urmează, în ordine descrescîndă, carotenoidele epoxidice, criptoxantinele și carotenoidele hidrocarburice.

Conținutul total și pe diferite fracțiuni al pigmenților carotenoidici din boabele celor 45 de hibrizi de porumb cercetați, în funcție de doza de azotat de amoniu aplicată la hectar, pe cele trei loturi, este prezentat grafic în figurile 1 și 2.

În majoritatea cazurilor (42 probe din 45), conținutul total al carotenoidelor aceluiași hibrid scade pe cele trei loturi, concomitent cu creșterea cantității de azotat de amoniu dată la hectar. Între conținutul total al pigmenților carotenoidici și cantitatea de azotat de amoniu dată la

hectar pe cele trei loturi există o relație invers proporțională. La probele la care nu se respectă această relație, deosebirile sînt mici și nesemnificative. Ele apar numai la boabele recoltate de pe două loturi vecine (A_1 și A_2 sau A_2 și A_3) și niciodată între loturile extreme (A_1 și A_3). Este posibil

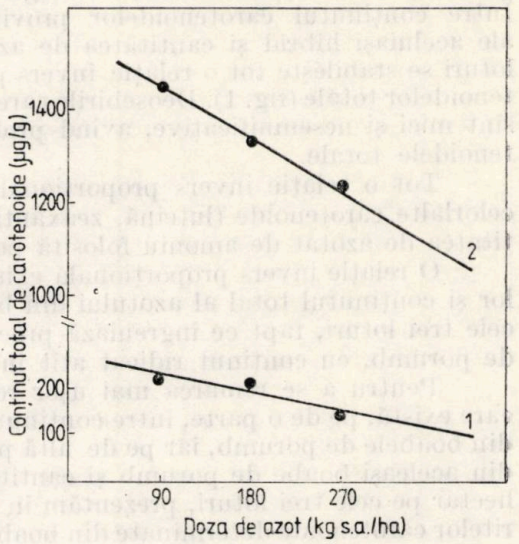


Fig. 1. — Relația dintre conținutul carotenoidelor totale, al carotenoidelor provitaminice și doza de azot aplicată la hectar: *1*, carotenoide totale; *2*, carotenoide provitaminice.

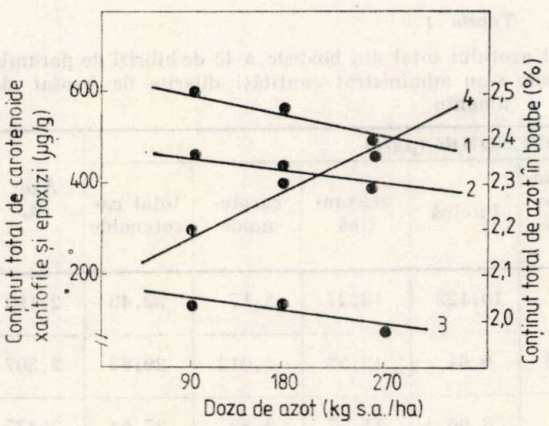


Fig. 2. — Relația dintre conținutul total al xantofilelor și al carotenoidelor epoxidice, conținutul de azot total din boabele de porumb și doza de azot aplicată la hectar: *1*, zeaxantină; *2*, luteină; *3*, epoxizi; *4*, azot total.

ca aceste deosebiri să se datoreze neîmprăștierii uniforme a îngrășămintelor sau faptului că nu toate plantele au absorbit azotat de amoniu în proporția dată pe cele trei loturi, precum și unor pierderi în timpul extragerii, purificării și dozării pigmenților. În toate cazurile, conținutul total al carotenoidelor din boabele hibridului cultivat pe lotul A_1, pe care s-au administrat 90 kg s.a./ha, este mai mare decît conținutul total al carotenoidelor din boabele aceluiași hibrid cultivat pe lotul A_3, pe care s-au administrat 270 kg s.a./ha. Deosebirile care apar în conținutul carotenoi-

delor totale din boabele de porumb recoltate de pe loturi vecine sînt mici, fiind cuprinse între 0,31 și 1,3 μg/g.

Carotenoidele provitaminice constituie pigmenții cei mai importanți din boabele de porumb deoarece din ei omul și animalele își sintetizează vitamina A și alte substanțe biologic active derivate din carotenoide. Între conținutul carotenoidelor provitaminice din boabele de porumb ale aceluiași hibrid și cantitatea de azotat de amoniu dată pe cele trei loturi se stabilește tot o relație invers proporțională, ca și în cazul carotenoidelor totale (fig. 1). Deosebirile care apar și la acest tip de carotenoide sînt mici și nesemnificative, avînd probabil aceleași cauze ca și la carotenoidele totale.

Tot o relație invers proporțională se stabilește și între conținutul celorlalte carotenoide (luteină, zeaxantină, carotenoide epoxidice) și cantitatea de azotat de amoniu folosită pe cele trei loturi (fig. 2).

O relație invers proporțională există și între conținutul carotenoidelor și conținutul total al azotului din boabele aceluiași hibrid cultivat pe cele trei loturi, fapt ce îngreuiază procesul de obținere a unor forme noi de porumb, cu conținut ridicat atît în proteine cît și în carotenoide.

Pentru a se remarca mai ușor relația de proporționalitate inversă care există, pe de o parte, între conținutul diferitelor tipuri de carotenoide din boabele de porumb, iar pe de altă parte între conținutul azotului total din aceleași boabe de porumb și cantitatea de azotat de amoniu dată la hectar pe cele trei loturi, prezentăm în tabela 1 conținutul mediu al diferitelor carotenoide determinate din boabele celor 45 de hibrizi de porumb, separat pe cele trei loturi, precum și conținutul mediu al azotului total.

Tabela 1

Conținutul mediu al carotenoidelor și al azotului total din boabele a 45 de hibrizi de porumb, cultivați pe trei loturi comparative, pe care s-au administrat cantități diferite de azotat de amoniu

Lot	CAROTENOIDE (μg/g)							Azot %
	carotenoide hidrocarburice	criptoxantine	carotenoide provitaminice	luteină	zeaxantină	carotenoide	total carotenoide	
A_1	1,96	3,904	5,19	10,123	13,27	3,17	32,43	2,190
A_2	1,77	2,900	4,696	9,61	12,53	3,012	29,82	2,307
A_3	1,63	2,68	4,31	8,96	11,37	2,89	27,54	2,377

Între conținutul total al azotului din boabele de porumb provenite de la hibrizii cultivați pe cele trei loturi și cantitatea de azotat de amoniu dată la hectar există o relație direct proporțională, așa cum era de așteptat. Deosebirile dintre conținutul mediu al azotului total sînt mai mari între hibrizii cultivați pe loturile A_1 și A_2 decît între cei de pe loturile A_2 și A_3, fapt ce denotă că pe lotul A_3 s-au adăugat cantități prea mari de azotat de amoniu, fără ca acesta să fie valorificat integral de către plante. Cantitatea optimă de îngrășăminte este cea dată probabil lotului A_2, adică 180 kg s.a. la hectar.

CONCLUZII

1. Din cercetările efectuate reiese că între pigmenții carotenoidici din boabele provenite de la 45 de hibrizi de porumb cultivați pe trei loturi comparative, pe care s-au administrat cantități diferite de azotat de amoniu, există numai deosebiri cantitative, nu și calitative.

2. La toți hibrizii cercetați, pigmenții carotenoidici principali din boabele de porumb sînt zeaxantina și luteina, după care urmează, sub aspect cantitativ, epoxizii, criptoxantinele și carotenoidele hidrocarburice.

3. Conținutul carotenoidelor din boabele aceluiași hibrid cultivat pe trei loturi diferite scade proporțional cu creșterea cantității azotatului de amoniu dată la hectar.

4. Între conținutul total și pe diferite tipuri de carotenoide din boabele de porumb și conținutul azotului total și cantitatea de azotat de amoniu dată pe loturile de cultură există o relație invers proporțională.

5. Între conținutul azotului total din boabele de porumb și cantitatea de azotat de amoniu dată la hectar pe trei loturi de cultură cu același tip de sol există o proporționalitate directă.

Prezentat la redacție
la 16 martie 1984

* *Disciplina de chimie și biochimie vegetală, Institutul agronomic „Dr. Petru Groza". Cluj-Napoca*
** *Stațiunea de cercetări agricole Turda, jud. Cluj*
*** *Laboratorul de izotopi radioactivi, Institutul agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj-Napoca*

BIOCHEMICAL RESEARCHES OF CAROTENOIDS IN MAIZE. III. CAROTENOID AND TOTAL NITROGEN CONTENTS OF DIPLOID HYBRID MAIZE GRAINS

SUMMARY

A number of 45 hybrid diploid normal maize were studied for the carotenoid pigments and N-total; the plants grew on the same kind of soil but on three comparative plots on which different quantities of N-containing NH_4NO_3 were spread.

The correlation between the nature and contents of carotenoids, N-total in grains and the nitrogen dose applied per hectare was studied.

The experimental data revealed inversely proportional relationships between the average carotenoid contents in the same hybrids cultivated on three comparative plots (32.43 μg/g; 29.82 μg/g and 27.54 μg/g) and the nitrogen quantity applied per hectare (90, 180 and 270 kg/ha, respectively).

The N-total contents in maize grains (2.19%; 2.30%; 2.37%) increase with the nitrogen quantity applied per hectare. Ammonium nitrate does not play any part in the nature of carotenoids but it does so inasmuch as their contents are concerned.

BIBLIOGRAFIE

1. A. S. WATSON, Proceedings of the 17th Corn Research Conference, 1962, p. 92—100.
2. A. M. BRUNSON, F. W. QUACKENBUSH, Crop Sci., **2**, 344 (1962).
3. C. O. GROGAN, C. W. BLESSIN, Crop Sci., **8**, 730 (1968).
4. I. CĂBULEA, GH. ILLYES, C. BILĂUȘ, Genetica Agraria, **24**, 105 (1970).
5. C. BODEA, V. FĂRCĂȘAN, E. NICOARĂ, H. SLUȘANSCHI, *Tratat de biochimie vegetală*, vol. I, Edit. Academiei, București, 1966, p. 520.
6. T. W. GOODWIN, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, ed. a 2-a, vol. II, Academic Press, New York—London, 1976, p. 38.
7. G. NEAMȚU, *Biochimie vegetală*, Edit. Ceres, București, 1981, p. 200.
8. G. NEAMȚU, GH. ILLYES, E. PESCARU Buletin IACN.-A, **36**, 55 (1982).
9. G. NEAMȚU, C. PANFIL, C. BOTEZ, GH. ILLYES, K L. SIMPSON, St. cerc. biochim., **26**, 58 (1983).
10. G. NEAMȚU, I. CĂBULEA, C. BOTEZ, GH. ILLYES, FL. IRIMIE, St. cerc. biochim., **27**, 63 (1984).
11. I. CĂBULEA, C. OCHEȘAN, G. NEAMȚU, V. LEGMAN, GH. ILLYES, Analele ICCPT-Fundulea (1983).
12. I. CĂBULEA, G. NEAMȚU, C. OCHEȘAN, GH. ILLYES, Simpozion omagial, Academia R.S.R., Subcomisia de biochimie Cluj-Napoca, 1983, p. 42.
13. * * * *The Analysis of Agricultural Materials*, Technical Bulletin 27, London (1973).

UNELE ASPECTE PRIVIND OBȚINEREA ȘI COMPORTAREA AMIDONULUI RETICULAT CA SUBSTRAT AL α-AMILAZEI

V. OSTAFE, S. E. SZEDLACSEK, M. A. MATEESCU

Rezumat. S-a urmărit optimizarea procesului de reticulare a amidonului cu epiclorhidrină, în scopul obținerii unui substrat adecvat pentru determinarea selectivă a α-amilazei. S-a obținut un produs uniform reticulat și cu randament ridicat prin efectuarea reticulării într-o soluție de NaOH 0,5 N, agentul de reticulare fiind adăugat sub forma unei soluții în acetonă.
A fost efectuat studiul cinetic al acțiunii α-amilazei asupra amidonului cu diferite grade de reticulare, urmărindu-se atît influența concentrațiilor de enzimă cît și a celor de substrate asupra vitezelor de reacție. S-a pus în evidență faptul că vitezele de reacție scad cu creșterea gradului de reticulare ; mai mult, viteza de reacție depinde linear de volumul de gonflare al substratului reticulat folosit. Aceste rezultate sugerează că punțile eterice de tipul $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-O-$ introduse la reticularea cu epiclorhidrină generează efecte de împiedicare sterică a acțiunii α-amilazei.

α-Amilaza (E.C. 3.2.1.1) este o enzimă larg răspîndită în natură, cu un important rol biologic și numeroase implicații medicale și biotehnologice. Introducerea testelor de amilazemie și amilazurie în diagnosticul de laborator al unor maladii (pancreatite acute, insuficiență renală etc.), pe de o parte, și necesitatea unor procedee adecvate pentru controlul proceselor legate de acțiunea α-amilazei, pe de altă parte, au condus la elaborarea unor noi tipuri de metode de determinare a enzimei. Unele din aceste metode se bazează pe utilizarea de substrate de semisinteză de tip amiloză reticulată (1), (2) sau amidon reticulat (3), ca atare sau funcționalizat cu cromogeni (4), (5). Avantajul utilizării acestor substrate modificate chimic constă în faptul că ele permit determinarea selectivă a α-amilazei și în prezența exoamilazelor contaminante (β-amilaza, glucoamilaza) a căror acțiune este blocată la nivelul punților transversale introduse prin reticulare cu agenți bifuncționali (epiclorhidrină) (6), (7) și la nivelul unităților glucidice purtătoare de coloranți (8).

Avînd în vedere interesul crescut pentru aceste tipuri de metode, am considerat util un studiu asupra amidonului cu diferite grade de reticulare, atît sub aspectul procesului de sinteză, cît și al comportării sale ca substrat al acțiunii α-amilazei.

MATERIALE ȘI METODE

S-au utilizat amidon din porumb și α-amilază pancreatică (Carl-Roth, Karlsruhe).

Obținerea amidonului reticulat. Reticularea a fost efectuată prin tratarea amidonului cu epiclorhidrină și în mediu alcalin, ținînd seamă de condițiile descrise pentru reticularea agaro-

zei (9), alcoolului polivinilic (10) şi amilozei (11) şi de cele descrise de Weber şi colab. (12) pentru reticularea amidonului, la care s-au adus unele modificări.

Modul de lucru este următorul: un amestec conţinînd 100 ml soluţie NaOH 5 N şi 33 g amidon se agită pînă la omogenizare, se menţine 2 ore la temperatura de 0—2°C, după care se adaugă cantitatea de epiclorhidrină necesară gradului de reticulare dorit. S-a notat cu AdX_0 amidonul reticulat, unde *n* reprezintă cantitatea de epiclorhidrină în grame, utilizată pentru reticularea a 100 g amidon (3). Epiclorhidrina necesară a fost dizolvată într-un volum de acetonă egal cu 25% din volumul soluţiei de NaOH 5 N. După omogenizarea amestecului, masa de reacţie s-a păstrat în continuare la rece timp de o oră, după care s-a termostatat 2 ore la 45°C şi o oră la 65°C. Gelurile obţinute, tratate cu o soluţie de acid acetic 2 N în exces şi apoi spălate cu apă fierbinte şi granulate în stare umedă prin trecere pe o sită fină (dimensiuni mai mici de 0,2 mm), au fost trecute ulterior în stare uscată prin deshidratare blîndă cu acetonă (13), după care au fost cernute, reţinîndu-se particule cu granulaţia între 0,2 şi 0,25 mm.

S-au obţinut astfel produşii $AdX_{0,5}$, AdX_1, AdX_2, $AdX_{3,5}$, AdX_5, AdX_{10}, pentru fiecare dintre ei stabilindu-se volumul de gonflare (ml gel/g produs uscat) măsurat după 24 de ore, care reflectă gradul de reticulare al produsului.

Au fost efectuate de asemenea reticulări utilizînd diferite alte concentraţii de hidroxid de sodiu şi diferiţi solvenţi pentru dizolvarea epiclorhidrinei.

Studiul cinetic al acţiunii α-amilazei asupra amidonului cu diferite grade de reticulare. Activităţile α-amilazice au fost determinate prin metoda reductometrică Somogyi-Nelson (14), utilizîndu-se ca substrat o soluţie de amidon solubil 0,5%, în soluţie tampon fosfat 0,05 M, pH 6. Activităţile au fost exprimate în U/ml, o unitate enzimatică reprezentînd cantitatea de enzimă care eliberează 1 μmol glucide reducătoare/minut, la temperatura de 25°C. Preparatul enzimatic utilizat a prezentat o activitate amilolitică de 3 U/mg.

Influenţa concentraţiilor de α-amilază asupra vitezelor de reacţie a fost urmărită utilizîndu-se ca substrate amidon de porumb ca atare (pulbere), amidon de porumb solubilizat prin fierbere şi amidon cu diferite grade de reticulare. În toate cazurile, probele au fost constituite din 50 mg substrat în 1,5 ml soluţie tampon menţionat şi 0,5 ml soluţie α-amilazică în concentraţii de 0,4, 1,0, 2,0, 3,0 şi 4,0 mg/ml. În cazul substratelor insolubile, reacţiile enzimatice au fost efectuate după o gonflare prealabilă de circa 18 ore. Reacţiile enzimatice au fost conduse la temperatura de 10°C, sub agitare magnetică. Stoparea a fost efectuată după 2 minute, prin adaosul de reactiv.

Influenţa concentraţiilor de substrat asupra vitezelor de reacţie a fost studiată în condiţii asemănătoare, menţinîndu-se o cantitate constantă de 1 mg α-amilază/probă şi folosindu-se concentraţii de substrat de 10—15 mg/probă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În scopul obţinerii de substrate de tip amidon reticulat cu o reticulare cît mai omogenă, am urmărit, pe de o parte, scăderea consistenţei amestecului amidon — soluţie NaOH în vederea facilitării procesului de omogenizare, iar pe de altă parte o distribuire cît mai uniformă a epiclorhidrinei în amestecul rezultat.

Adăugarea de epiclorhidrină ca atare creează neuniformităţi de reticulare datorită insolubilităţii ei în apa prezentă în masa de reacţie. De aceea s-a trecut la solubilizarea prealabilă a epiclorhidrinei în diferiţi solvenţi organici cu caracter polar, miscibili cu apa. Acetona a corespuns din punctul de vedere al lipsei de reactivitate faţă de reactanţi (hidroxid de sodiu, epiclorhidrină) şi al solubilităţii în mediul apos.

Este bine cunoscut faptul că gradul de reticulare este influenţat de raportul dintre concentraţiile celor trei reactanţi: amidon/hidroxid de sodiu/epiclorhidrină (12). Deoarece gradul de reticulare variază cu condiţiile de lucru, am atribuit acelaşi grad de reticulare la doi produşi cu acelaşi volum de gonflare, obţinuţi prin oricare din variantele expuse în această lucrare.

În scopul realizării unui produs adecvat şi în vederea obţinerii de informaţii privind influenţa diverşilor factori asupra gradului de reticulare, am urmărit modul în care se repercutează modificările condiţiilor de reacţie asupra procesului de reticulare. Astfel am mărit volumul soluţiei de hidroxid de sodiu, menţinînd constante cantităţile de amidon şi epiclorhidrină. Am constatat în acest caz o micşorare a consistenţei masei

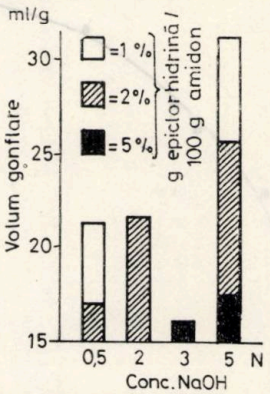


Fig. 1. — Influenţa concentraţiei de hidroxid de sodiu asupra volumului de gonflare.

de reacţie şi în acelaşi timp o reducere corespunzătoare a gradului de reticulare.

Ulterior am urmărit influenţa diferitelor concentraţii de hidroxid de sodiu asupra gradului de reticulare. Experimentele au fost efectuate menţinînd constante cantităţile de amidon (100 g), epiclorhidrină (2 g) şi volumul soluţiei de hidroxid de sodiu (300 ml), dar variind concentraţiile soluţiilor de NaOH în limitele 0,5—5 N. Rezultatele obţinute sînt prezentate în figura 1. La concentraţii mici de hidroxid de sodiu se constată o reticulare mai avansată, concomitentă cu scăderea consistenţei masei de reacţie şi cu creşterea randamentului de obţinere a produsului (de la 62%,

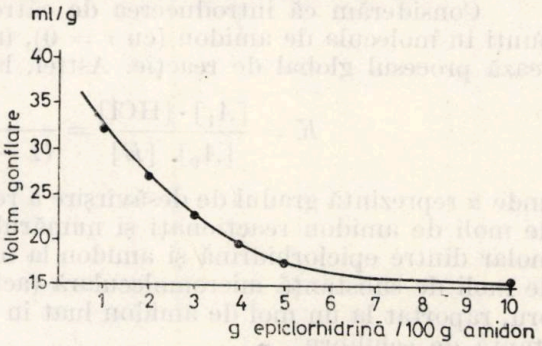


Fig. 2. — Influenţa cantităţii de epiclorhidrină asupra volumului de gonflare a amidonului reticulat.

în cazul soluţiei de NaOH 5 N, la 80%, pentru soluţia NaOH 0,5 N).

Din cele prezentate se poate considera că este avantajoasă folosirea unei soluţii de NaOH 0,5 N în raportul de 300 ml soluţie/100 g amidon.

Influenţa cantităţii de epiclorhidrină asupra gradului de reticulare şi implicit asupra capacităţii de gonflare este prezentată în figura 2.

Se constată că volumul de gonflare scade nelinear cu creşterea raportului epiclorhidrină/amidon; rezultate asemănătoare s-au observat şi în cazul amilozei reticulate (15).

Raportul epiclorhidrină/amidon influenţează de asemenea şi randamentul de obţinere a produsului. Rezultatele experimentale prezentate în figura 3 arată că mărirea raportului epiclorhidrină/amidon duce la creşterea asimptotică spre 100% a randamentului.

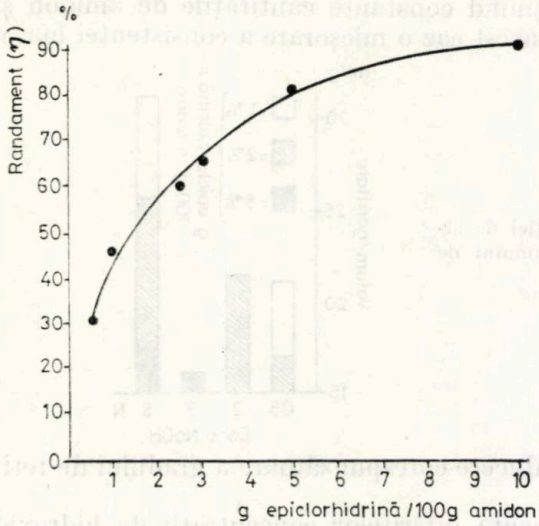


Fig. 3. — Influenţa cantităţii de epiclorhidrină asupra randamentului de obţinere a amidonului reticulat.

Rezultatul obţinut poate fi justificat astfel:
Fie ecuaţia reacţiei de reticulare:

$$A_r + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} A_{r+1} + \mathrm{HCl},$$

unde A_r reprezintă o moleculă de amidon cu r punţi de reticulare, iar E o moleculă de epiclorhidrină.

Considerăm că introducerea de către epiclorhidrină a unei singure punţi în molecula de amidon (cu $r = 0$), în primă aproximaţie, caracterizează procesul global de reacţie. Astfel, la echilibru avem (16):

$$K = \frac{[A_1] \cdot [\mathrm{HCl}]}{[A_0] \cdot [E]} = \frac{\alpha \cdot n_H}{(1 - \alpha)(p - \alpha)}, \qquad (1)$$

unde α reprezintă gradul de desăvîrşire a reacţiei (raportul dintre numărul de moli de amidon reacţionaţi şi numărul iniţial de moli), p = raportul molar dintre epiclorhidrină şi amidon la momentul iniţial, n_H = numărul de moli de substanţă micromoleculară (acid clorhidric) formaţi la echilibru, raportat la un mol de amidon luat în reacţie, iar $K = k_1/k_{-1}$ = constanta de echilibru.

Din relaţia (1) rezultă:

$$K\alpha^2 - [(p + 1)K + n_H]\alpha + Kp = 0. \qquad (2)$$

De aici se obţine $p = f(\alpha)$:

$$p = \frac{(1 + n_H/K)\alpha - \alpha^2}{1 - \alpha}. \qquad (3)$$

Un calcul simplu arată că $dp/d\alpha = 1 + (n_H/K)/(1 - \alpha)^2 > 0$, iar derivata a doua este de asemenea pozitivă.

Prin urmare, funcția $p = f(\alpha)$ pe intervalul $[0, 1)$ este strict crescătoare, avînd ca asimptotă verticală dreapta $\alpha = 1$.

Aproximînd gradul de desăvîrșire a reacției α (exprimat în procente) cu randamentul η (g produs reticulat obținut la 100 g amidon) și ținînd seama că α este proporțional cu raportul masic inițial n dintre epiclorhidrină și amidon, rezultă o deplină concordanță între curba $p = f(\alpha)$ obținută teoretic și curba experimentală $n = f(\eta)$ (fig. 3).

Gradul de reticulare al amidonului influențează în mod pregnant calitățile de substrat ale acțiunii α-amilazei. Influența concentrațiilor de α-amilază asupra vitezelor de hidroliză a amidonului cu diferite grade de reticulare este prezentată în figura 4. Menționăm aici că determinările cinetice au fost efectuate la 10°C, temperatură găsită optimă în urma unor testări preliminare, în vederea menținerii controlului cinetic asupra vitezei de degradare a substratului insolubil (minimizarea efectelor difuziilor interne și externe) (17).

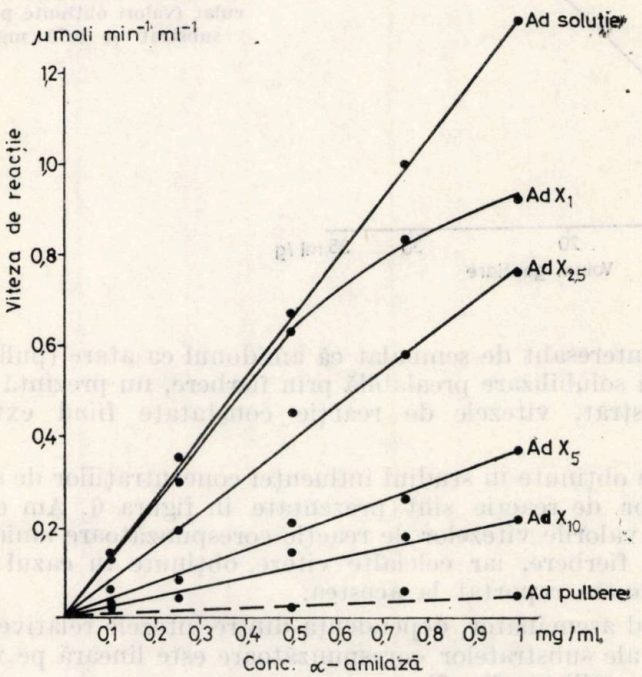


Fig. 4. — Influența concentrațiilor de enzimă asupra vitezei de hidroliză a amidonului cu diferite grade de reticulare (în toate cazurile, concentrația de substrat a fost de 25 mg/ml).

Se observă că, în cazul fiecărui grad de reticulare, viteza de reacție crește odată cu creșterea concentrației de enzimă. La aceeași concentrație de enzimă însă, viteza de reacție este cu atît mai scăzută cu cît reticularea este mai avansată.

Reprezentînd variația vitezei de hidroliză enzimatică în funcție de volumele de gonflare corespunzătoare gradelor de reticulare folosite,

se constată o dependență liniară pe tot domeniul de reticulare studiat. O reprezentare analogă a vitezei de reacție în funcție de procentul de epiclorhidrină utilizat nu este liniară. Abaterea de la linearitate din acest caz se compensează cu abaterea similară de la linearitate a dependenței de procentul de epiclorhidrină al volumului de gonflare, conducînd la profilul linear din figura 5.

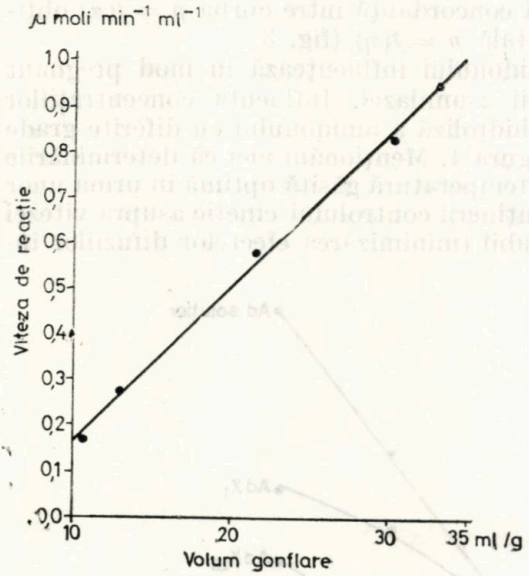


Fig. 5. — Variația vitezei de reacție cu volumul de gonflare al substratului reticulat (valori obținute pentru 25 mg/ml substrat și 0,75 mg/ml enzimă).

Este interesant de semnalat că amidonul ca atare (pulbere), nereticulat și fără solubilizare prealabilă prin fierbere, nu prezintă practic calități de substrat, vitezele de reacție constatate fiind extrem de reduse.

Datele obținute în studiul influenței concentrațiilor de substrat asupra vitezelor de reacție sînt prezentate în figura 6. Am considerat ca fiind 100% valorile vitezelor de reacție corespunzătoare amidonului solubilizat prin fierbere, iar celelalte viteze, obținute în cazul substratelor reticulate, le-am raportat la acestea.

În mod asemănător, dependența dintre vitezele relative și volumele de gonflare ale substratelor corespunzătoare este liniară pe tot domeniul de reticulare utilizat (fig. 7).

Acceptînd că reacțiile în sistem heterogen dintre amidonul reticulat și α-amilază s-au desfășurat sub control cinetic, se pot calcula constante Michaelis aparente K'_m. Valorile reciproce ale acestora reflectă în aceste condiții, într-o anumită măsură, afinitatea enzimei pentru diferitele substrate menționate. Totuși, nu este exclusă posibilitatea ca valorile K'_m să reprezinte medieri ale mai multor procese de interfață solid-lichid, care au loc în timpul migrării și al atacului enzimei asupra substratului insolubil.

Astfel, în tabela 1 sînt date valorile estimative ale K'_m pentru α-amilază, avînd ca substrat amidon cu diferite grade de reticulare.

Aceste date dovedesc încă o dată că susceptibilitatea amidonului reticulat la α-amilază scade cu creșterea gradului de reticulare. Dependența

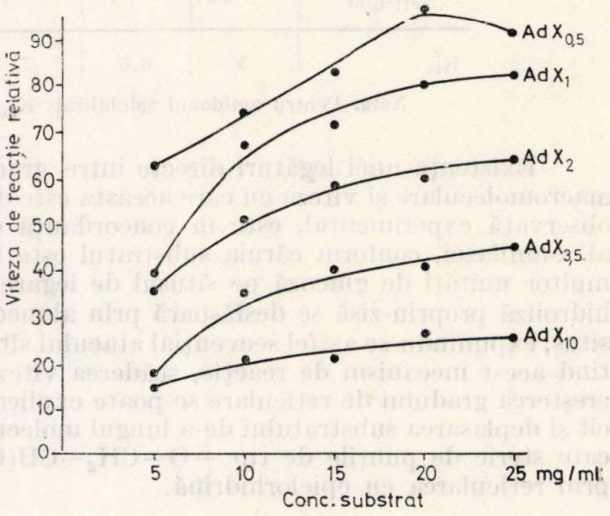


Fig. 6. — Influența concentrațiilor de substrat cu diferite grade de reticulare asupra vitezei de reacție a α-amilazei (în toate cazurile, concentrația de enzimă a fost de 0,5 mg/ml).

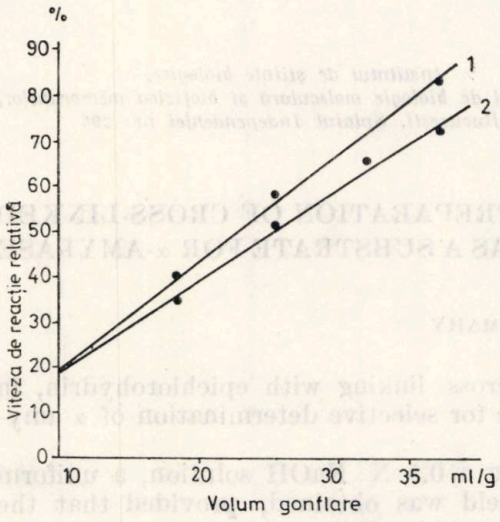


Fig. 7. — Variația vitezei relative de reacție cu volumul de gonflare al substratului reticulat (valori obținute pentru 15 mg/ml substrat și 0,5 mg/ml enzimă (*1*) și 10 mg/ml substrat și 0,5 mg/ml enzimă (*2*)).

lineară dintre vitezele de hidroliză enzimatică și volumele de gonflare ale substratelor reticulate ne sugerează, ca o alternativă, posibilitatea determinării gradului de reticulare, pe baza degradării sale de către un preparat enzimatic cu activitate dată.

Tabela 1

Valorile K'_m ale α-amilazei pentru amidon cu diferite grade de reticulare

Substrat reticulat	$AdX_{0,5}$	AdX_1	AdX_2	$AdX_{3,5}$	AdX_5
K'_m	5	6,5	7	9	15,5

Notă. Pentru amidonul solubilizat, $K_m = 1$.

Existenţa unei legături directe între gradul de reticulare al reţelei macromoleculare şi viteza cu care aceasta este degradată de către enzimă, observată experimental, este în concordanţă cu mecanismul de acţiune al α-amilazei, conform căruia substratul este fixat prin intermediul mai multor unităţi de glucoză pe situsul de legare al enzimei, iar reacţia de hidroliză propriu-zisă se desfăşoară prin alunecarea substratului pe acest situs, expunîndu-se astfel secvenţial atacului situsului catalitic (18). Acceptînd acest mecanism de reacţie, scăderea vitezelor de hidroliză odată cu creşterea gradului de reticulare se poate explica prin faptul că atît fixarea cît şi deplasarea substratului de-a lungul moleculei de enzimă sînt împiedicate steric de punţile de tip $-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-O-$ introduse prin reticularea cu epiclorhidrină.

Autorii sînt recunoscători dr. Horst D. Schell pentru sprijinul şi atenţia acordată acestei lucrări.

Prezentat la redacţie
la 31 mai 1984

Institutul de ştiinţe biologice,
Laboratorul de biologie moleculară şi biofizica membranelor,
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

ASPECTS CONCERNING THE PREPARATION OF CROSS-LINKED STARCH AND ITS BEHAVIOR AS A SUBSTRATE FOR α-AMYLASE

SUMMARY

The optimisation of starch cross linking with epichlorohydrin, in order to achieve a proper substrate for selective determination of α-amylase, was investigated.

Performing the reticulation in a 0.5 N NaOH solution, a uniform cross-linked product with high yield was obtained, provided that the cross-linking agent is added in acetone solution.

The kinetic investigation of α-amylase on starch with various reticulation degrees was carried out, studying the influence of both enzyme and substrate concentrations on the reaction rates.

Evidence is presented that reaction velocities decrease simultaneously with the increase of cross-linking degree; moreover, a linear

dependence between the reaction rate and the gel bed volume of cross-linked substrates was found.

These results suggest that the bridges introduced, by epichlorohydrin cross linking generate some steric hindrances for the α-amylase action, more pronounced in the case of higher reticulation degrees.

BIBLIOGRAFIE

1. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, F. MIHĂILESCU, I. CORNOIU, Biochimie, **58**, 875 (1976).
2. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, Carbohydr. Res., **124**, 319 (1983).
3. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, E. ENACHE, T. BENȚIA, T. VÂLSĂNESCU, V. ZARCHIEVICI, C. ROTARU, St. cerc. biochim., **26**, 156 (1983).
4. M. CESKA, K. BIRATH, B. BROWN, Clin. chim. Acta, **26**, 437 (1969).
5. M. CESKA, E. HULTMAN, B. INGELMAN, Experientia, **25**, 555 (1969).
6. M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, I. CORNOIU, Anal. Letters, **13**, 1567 (1980).
7. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, T. BENȚIA, A. JIFCU, Anal. Letters, **14**, 1601 (1981).
8. J. J. MARSHALL, Anal. Biochem., **37**, 466 (1970).
9. H. D. SCHELL, V. GHEȚIE, Romanian Biochem. Lett., **1**, 30 (1970).
10. H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, M. DIMONIE, C. V. OPRESCU, T. BENȚIA, Brevet R.S. România 74486/1980.
11. M. ȘERBAN, M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, Brevet R.S. România 61524/1976.
12. M. WEBER, M. D. FOGLIETTI, F. PERCHERON, Biochimie, **58**, 1299 (1976).
13. V. GHEȚIE, H. D. SCHELL, Experientia, **27**, 1384 (1971).
14. M. SOMOGYI, Clin. Chem., **6**, 23 (1960).
15. M. ȘERBAN, H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, Rev. roum. Biochim., **12**, 187 (1975).
16. C. SIMIONESCU, V. BULACOVSCHI, *Tratat de chimia compușilor macromoleculari*, Edit. didactică și pedagogică, București, 1976.
17. L. GOLDSTEIN, Methods Enzymol., **44**, 397 (1976).
18. M. ABDULLAH, D. FRENCH, J. F. ROBYT, Arch. Biochem. Biophys., **114**, 595 (1966).

INTERACȚIUNEA LACTOPEROXIDAZEI UMANE CU UNELE COMPONENTE DIN LAPTE

EUGENIA PANDELE

Rezumat. Studiul interacțiunii lactoperoxidazei (LPO) umane cu unele componente din lapte, ca α-lactalbumină, imunoglobulină A secretoare (SIgA), lactoferină (LF) și lizozim (LIZ), s-a realizat prin determinarea activității LPO cu fiecare componentă în parte, în prezența pirogalolului. S-a demonstrat efectul sinergic cu lactoferină și cu SIgA, cu o potențare a activității peroxidazice cu 22% la raporturi între LPO și componente de 10/1 și, respectiv, 1/1. Efectul sinergic major este obținut cu lizozim, care atinge la un raport LPO/LIZ cuprins între 2/1 și 4/1 o creștere a activității de 100%. Creșterea pînă la dublu a activității enzimatice a LPO în prezența urmelor de lizozim indică interacțiunea dintre componente ca factor compensator al cantităților lor reduse în laptele matern.

Proprietățile antibacteriene ale laptelui matern se datoresc sistemului imun propriu reprezentat de SIgA, dar aproape în aceeași măsură unor sisteme inhibitorii nespecifice în care sînt cuprinse în principal lizozimul, lactoferina și lactoperoxidaza.

Cu toate că se găsesc în cantități foarte mici în laptele uman, s-a dovedit, atît in vivo cît și in vitro, că lizozimul și mai ales lactoperoxidaza sînt agenți puternic antibacterieni, care suplinesc apărarea la nivelul mucoaselor pînă la instalarea răspunsului imun propriu (1), (2). Aceleași sisteme nespecifice se găsesc distribuite în majoritatea secrețiilor de mucoase, avînd și la acest nivel un rol protector antiinfecțios (3).

Lactoperoxidaza din laptele uman este o mieloperoxidază ce derivă din leucocite (4), explicîndu-se astfel cantitatea ei extrem de redusă față de peroxidaza din saliva umană, care este similară cu lactoperoxidaza bovină, ambele derivînd din glandele acinare (5).

Dacă activitatea antibacteriană a factorilor nespecifici a fost studiată în ultimii ani (2), interacțiunea lor reciprocă a fost extrem de puțin luată în considerare, atît în studiile in vitro, cît și în cele in vivo (6), (7), (8), (9).

În lucrarea de față ne-am propus să studiem sinergismul de acțiune dintre LPO și principalele componente din laptele uman, ca α-lactalbumina, SIgA, lactoferina și lizozimul, pentru a încerca să contribuim la lămurirea discordanței dintre cantitățile extrem de mici ale componentelor neimune și activitatea puternic bactericidă a laptelui.

MATERIAL, METODE ȘI MODUL DE LUCRU

LPO a fost separată din colostru uman, după delipidare și decazeinificare, prin cromatografie de afinitate (10), obținîndu-se șarje cu concentrații proteice și activități enzimatice foarte diferite. Această variație se poate datora colostrului întrebuințat. Prin colostru am înțeles laptele matern colectat în primele cinci zile de la naștere. S-a lucrat cu un amestec de preparate

care avea o concentrație proteică de 116 μg/ml și o activitate enzimatică de 164 μmoli/ml/min/25°C. Activitatea enzimatică s-a determinat în prezența pirogalolului (11).

Celelalte componente din lapte au fost obținute după metoda Parry și colab. (12) pentru lizozim, după metoda Forsum (13) pentru α-lactalbumină, după indicațiile lui Newcomb și colab. (14) pentru imunoglobulina A secretoare și după metoda Got (15) pentru lactoferină.

Studierea acțiunii sinergice a celorlalte componente din lapte cu LPO a fost făcută prin folosirea fiecărei componente în cîte patru diluții seriale față de LPO la o singură concentrație.

Probe martor au fost martorul enzimei, notat M_1, care a constat din preparatul de LPO, în tampon fosfat 0,02 M, pH 7,2 și martorul componentei, notat M_2, care a constat din componenta în ser fiziologic în diluțiile seriale întrebuințate. Martorul M_2 nu a avut activitate peroxidazică în nici o probă la nici o concentrație, dovedind că respectivele componente nu au fost impurificate cu LPO. În consecință, martorii M_2 nu au mai fost prezentați.

Pentru fiecare componentă s-a folosit următoarea schemă de lucru:

M_1 = 0,1 ml LPO + 0,1 ml ser fiziologic
I = 0,1 ml LPO + 0,1 ml componentă la diluția inițială
II = 0,1 ml LPO + 0,1 ml componentă la diluția 1/2
III = 0,1 ml LPO + 0,1 ml componentă la diluția 1/4
IV = 0,1 ml LPO + 0,1 ml componentă la diluția 1/8

S-a stabilit ca diluție inițială a fiecărei componente o concentrație apropiată de concentrația LPO (116 μg/ml), și anume 100 μg/ml pentru α-lactalbumină, 270 μg/ml pentru SIgA, 100 μg/ml pentru lactoferină și 100 μg/ml pentru lizozim.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele au fost exprimate grafic.

α-Lactalbumina + LPO. După cum reiese din figura 1, α-lactalbumina în tampon Tris 0,2 M, pH 7,4 nu a modificat practic activitatea peroxidazică față de M_1.

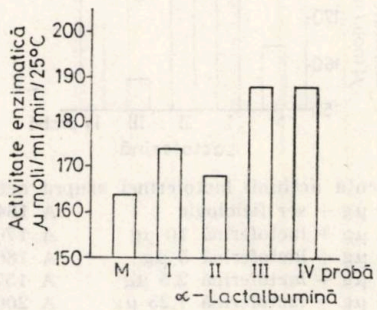


Fig. 1. — Influența acțiunii α-lactalbuminei asupra activității (A) LPO.

M_1	= LPO 11,6 μg + ser fiziologic		A 164 μmoli/ml/min
I	= LPO 11,6 μg + α-lactalbumină 10 μg		A 174 μmoli/ml/min
II	= LPO 11,6 μg + α-lactalbumină 5 μg		A 168 μmoli/ml/min
III	= LPO 11,6 μg + α-lactalbumină 2,5 μg		A 188 μmoli/ml/min
IV	= LPO 11,6 μg + α-lactalbumină 1,25 μg		A 188 μmoli/ml/min

SIgA + LPO. SIgA, dializată față de ser fiziologic, a produs o creștere a activității peroxidazice de 22% la o concentrație proteică apropiată de cea a LPO, fapt ilustrat în figura 2. Scăderea concentrației a readus activitatea în limitele normale.

Lactoferina + LPO. Din figura 3 reiese că lactoferina a potențat activitatea peroxidazică cu 22% numai la diluția cea mai mare, adică

la un raport de 10/1. Aceasta s-ar putea explica prin posibila intervenţie a Fe numai din lactoferina foarte diluată, în reacţia enzimatică a lacto peroxidazei.

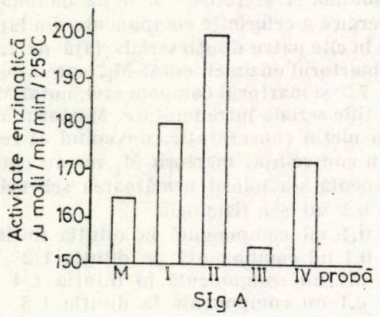


Fig. 2. — Influenţa acţiunii SIgA asupra activităţii LPO.

M_1	= LPO 11,6 µg + ser fiziologic	A 164	µmoli/ml/min
I	= LPO 11,6 µg + SIgA 27,0 µg	A 180	µmoli/ml/min
II	= LPO 11,6 µg + SIgA 13,5 µg	A 200	µmoli/ml/min
III	= LPO 11,6 µg + SIgA 6,75 µg	A 154	µmoli/ml/min
IV	= LPO 11,6 µg + SIgA 3,38 µg	A 172	µmoli/ml/min

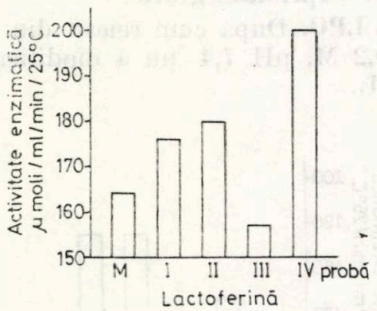


Fig. 3. — Influenţa acţiunii lactoferinei asupra activităţii LPO.

M_1	= LPO 11,6 µg + ser fiziologic	A 164	µmoli/ml/min
I	= LPO 11,6 µg + lactoferină 10 µg	A 176	µmoli/ml/min
II	= LPO 11,6 µg + lactoferină 5 µg	A 180	µmoli/ml/min
III	= LPO 11,6 µg + lactoferină 2,5 µg	A 157	µmoli/ml/min
IV	= LPO 11,6 µg + lactoferină 1,25 µg	A 200	µmoli/ml/min

Lizozimul + LPO. Lizozimul în ser fiziologic a potenţat puternic activitatea LPO cu 60—100%, dependent de concentraţia lizozimului (fig. 4). Astfel, potenţarea maximă s-a obţinut la raporturi între cantităţile de LPO şi LIZ cuprinse între 2/1 şi 4/1. Nu există totuşi o proporţionalitate între creşterea activităţii şi concentraţia lizozimului, ceea ce implică mai degrabă intervenţia lui în lanţul de reacţii declanşat de lactoperoxidază decît direct la centrul activ al enzimei.

Creşterea activităţii LPO în prezenţa celorlalte componente majore din lapte este asemănătoare creşterii activităţii litice a lizozimului în prezenţa aceloraşi componente (16). Cantităţile mari de SIgA prezente în laptele matern potenţează activitatea ambelor enzime, dar raportu-

rile dintre ele și SIgA sînt instabile, în sensul că, la mici modificări ale concentrațiilor lor, nu se mai obține o creștere a activității.

Activarea celor două enzime prin lactoferină are loc la raporturi nefiziologice, care implică cantități mari de enzime și cantități reduse de lactoferină.

Ca și în cazul urmăririi activității lizozimului (16), interacțiunea dintre peroxidază și lizozim produce o acțiune puternică de potențare

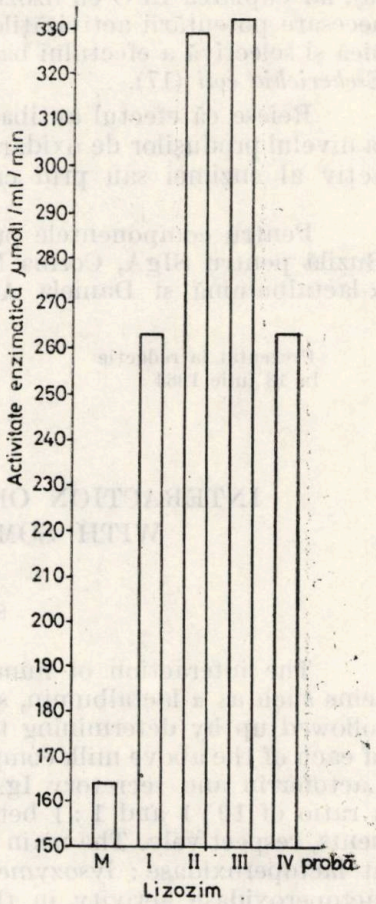


Fig. 4. — Influența acțiunii lizozimului asupra activității LPO.

M_1 = LPO 11,6 µg + ser fiziologic
A 164 µmoli/ml/min
I = LPO 11,6 µg + lizozim 10 µg
A 263 µmoli/ml/min
II = LPO 11,6 µg + lizozim 5 µg
A 329 µmoli/ml/min
III = LPO 11,6 µg + lizozim 2,5 µg
A 332 µmoli/ml/min
IV = LPO 11,6 µg + lizozim 1,25 µg
A 263 µmoli/ml/min

a activității peroxidazei. Mărimea raporturilor dintre ele demonstrează o interacțiune reciprocă, dovedindu-se astfel că interacțiunea LPO/LIZ este unul din factorii antiinfecțioși de bază ai laptelui matern.

Creșterea cu 100% a activității lactoperoxidazei în prezența urmelor de lizozim poate fi factorul compensator al cantității mici de peroxidază din laptele uman. Dar și dublarea activității lizozimului în prezența urmelor de LPO demonstrează interacțiunea reciprocă dintre lizozim și LPO, nesemnalată pînă în prezent.

Unul din mecanismele prin care pot avea loc sinergismele de acțiune dintre componente poate fi prinderea nespecifică a LPO de SIgA, care conduce la stabilizarea enzimei (9).

Întrucît LPO se cuplează și cu α-lactalbumina (9), de care nu este influențată, dar nu se cuplează cu lactoferina (9), care determină creșterea activității acesteia, reiese că nu acesta este mecanismul de acțiune.

Potențarea activității enzimatice prin interacțiune reciprocă este reflectată și la nivelul proprietăților lor antibacteriene (9), (17). Astfel, SIgA și lactoferina măresc capacitatea sistemului lactoperoxidazic de a inhiba acidifierea stimulată de glucoză, produsă de *Streptococcus mutans* (9), iar cuplarea LPO cu lizozim în anumite raporturi, asemănătoare celor necesare potențării activităților enzimatice, conduce la o creștere puternică și selectivă a efectului bactericid pe *S. aureus* și *Proteus* sp., și nu pe *Escherichia coli* (17).

Reiese că efectul antibacterian este datorat intervenției lizozimului la nivelul produșilor de oxidare a sistemului peroxidazic și nu al centrului activ al enzimei sau prin cuplarea lor nespecifică.

Pentru componentele puse la dispoziție, mulțumesc colegelor Lucia Buzilă pentru SIgA, Corina Mihail pentru lizozim, Florica Chelu pentru α-lactalbumină și Daniela Andrei pentru lactoferină.

Prezentat la redacție
la 18 iulie 1984

Institutul de științe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
București, Splaiul Independenței nr. 296

INTERACTION OF HUMAN LACTOPEROXIDASE WITH SOME MILK COMPONENTS

SUMMARY

The interaction of human lactoperoxidase with several milk proteins such as α-lactalbumin, secretory IgA, lactoferrin and lysozyme was followed up by determining the lactoperoxidase activity in the presence of each of the above milk components, using pyrogallol as hydrogen donor. Lactoferrin and secretory IgA increased the lactoperoxidase activity at a ratio of 10 : 1 and 1 : 1 between lactoperoxidase and the two components, respectively. The main synergic effect was recorded with lysozyme, at lactoperoxidase : lysozyme ratios of 2 : 1 and 4 : 1. The doubling of lactoperoxidase activity in the presence of trace amounts of lysozyme suggests that the interaction between these proteins may represent an additional mechanism to make up for their low content in the maternal milk.

BIBLIOGRAFIE

1. J. K. WELSH, J.T. MAY, J. Pediat., **9**, 1 (1979).
2. B. REITER, Ann. Rech. Vet., **9**, 205 (1978).
3. L. A. HANSON et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., **409**, 1 (1983).
4. Z. MOLDOVEANU, J. TENOVUO, J. MESTECKY, K. M. PRUITT, Biochim. biophys. Acta, **718**, 103 (1982).

5. M. MORRISSON, P. Z. ALLEN, J. BRIGHT, W. JAYASINGHE, Arch. Biochem. Biophys., **111**, 126 (1965).
6. I. R. HILL, P. PORTER, Immunology, **26**, 1239 (1971).
7. M. BAGGIOLINI, C. DE DUVE, P. J. MASSON, J. F. HEREMANS, J. exp. Med., **131**, 559 (1970).
8. I. L. SCHAUBACHA, R. S. SMITH, J. Dairy Sci., **55**, 715 (1971).
9. Z. MOLDOVEANU, J. TENOVUO, K. M. PRUITT, B. MANSSON-RAHEMTULLA, J. MESTECKY, Ann. N.Y. Acad. Sci., **409**, 848 (1983).
10. J. POMMIER, J. CAHMANN, J. biol. Chem., **254**, 3006 (1979).
11. I. BRAD, GH. OLTEANU, Z. MARCU, St. cerc. biochim., **12**, 323 (1969).
12. R. M. PARRY Jr., R. C. CHANDAN, K. M. SHAHANI, Arch. Biochem. Biophys., **130**, 59 (1969).
13. E. FORSUM, J. Dairy Sci., **59**, 14 (1976).
14. R. W. NEWCOMB, D. NORMANSELL, D. R. STANDWORTH, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
15. R. GOT, Clin. chim. Acta, **11**, 432 (1965).
16. C. MIHAIL, St. cerc. biochim., **26**, 50 (1983).
17. V. HERLEA, A. CIOLAC-RUSSU, C. MIHAIL, E. PANDELE, E. ENACHE, St. cerc. biochim., **27**, 133 (1984).

INCLUZII NUCLEARE ȘI LEZIUNI CITOPLASMICE ÎN HEPATOCITELE ȘOARECILOR INTOXICAȚI CU ACETAT DE PLUMB

PAULA PRUNESCU, C.-C. PRUNESCU

Rezumat. Inocularea intraperitoneală de acetat de plumb la șoareci este urmată de constituirea în nucleii hepatocitelor a unor corpi de incluzie, asemănători corpilor nucleari, care apar în celulele epiteliului renal după intoxicația cu plumb. În citoplasma hepatocitelor apar structuri care conțin lipide peroxidate de tipul lipofuscinelor, iar mitocondriile dilatate prezintă aspecte degenerative. Modificările care apar în nucleul și în citoplasma hepatocitelor par a fi reversibile.

Efectul sărurilor de plumb asupra animalelor de laborator a făcut obiectul a numeroase cercetări datorită implicațiilor medicale și sociale ale saturnismului.

La rozătoarele intoxicate cu plumb, principalul obiect de studiu l-a constituit rinichiul, organ în care se concentrează cantități mari de plumb. Cercetări histologice și de ultrastructură au evidențiat apariția, în nucleii celulelor epiteliului renal, a unor incluzii nucleare care conțin plumb (1), (2), (3).

Ficatul șobolanilor și al altor animale de laborator intoxicate cu plumb este sediul unor modificări minore la nivel structural. Spre deosebire de alte specii studiate, șoarecii intoxicați cu acetat de plumb prezintă incluzii nucleare caracteristice în nucleii hepatocitelor. Studiul acestor incluzii și al leziunilor citoplasmice din hepatocite constituie obiectul acestei lucrări.

MATERIAL ȘI METODE

Au fost inoculați intraperitoneal cu o soluție de acetat de plumb 10%, 10 șoareci bruni masculi adulți, din rasa C_3H. Dintre aceștia, 2 au fost sacrificați după 9 inoculări (3,7 mg acetat de plumb), alți 2 la 2 zile după 12 inoculări (4,6 mg acetat de plumb), iar alți 2 la 120 de zile după realizarea încărcării cu 4,6 mg acetat de plumb; 4 șoareci au murit în cursul experimentului. Fragmente de ficat au fost fixate în lichidul Helly, în vederea evidențierii histochimice a plumbului, conform tehnicii Cretin-Fairhall (4). Secțiunile au fost colorate cu metoda Perls (hemalaun-eozină) pentru evidențierea fierului și cu fucsină fenicată Ziehl pentru evidențierea lipofuscinelor. S-a realizat impregnarea argentică Gömöri pentru evidențierea colagenului

Pentru studiul ultrastructurii, fragmente mici de ficat au fost fixate în glutaraldehidă. 3% în tampon cacodilat la pH 7,3 și postfixate în soluție 1,33% OsO_4 în același tampon. Piesele incluse în LAC 6611 au fost secționate la un ultramicrotom Tesla, colorate cu acetat de uranil, contrastate cu citrat de plumb și examinate la un microscop electronic JEM 7, la 80 MeV.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

La animalele sacrificate în cursul încărcării cu acetat de plumb sau curînd după terminarea tratamentului, cei mai mulți nuclei ai hepatocitelor prezintă pe secțiuni histologice incluzii nucleare de formă circulară.

sau ovoidă, eozinofile, cu dimensiuni de 0,5—2—4 μ. Într-un nucleu se pot observa pînă la trei asemenea formaţiuni. După coloraţia Perls, incluziile rămîn translucide, fără a demonstra prezenţa fierului feric. În urma impregnării argentice, aceste structuri apar necolorate, în contrast cu fondul întunecat al carioplasmei.

În citoplasma hepatocitelor, la şoarecii intoxicaţi cu acetat de plumb se observă pe secţiuni histologice concentrări de pigment brun-gălbui, care după coloraţia cu fucsină fenicată Ziehl se dovedesc a fi granule de lipofuscină, acid-alcool-rezistente.

Pe secţiuni ultrafine, incluziile nucleare din hepatocite prezintă la microscopul electronic prin transmisie o structură caracteristică (fig. 1). Ele sînt formate dintr-o zonă centrală densă, relativ omogenă, alcătuită dintr-o împîslire de material fin fibrilar. Zona marginală se prezintă ca o coroană radiară, constituită din filamente de lungimi diferite, care pătrund în carioplasmă. Incluziile nucleare nu sînt delimitate de o membrană şi nici nu prezintă o zonă netă de demarcaţie faţă de carioplasmă. Nu au fost observate incluzii nucleare în apropierea membranei nucleare sau lîngă nucleol. În unele celule, nucleolul prezintă pe secţiunea ultrafină o formă caracteristică de inel (fig. 1, insert).

La animalele sacrificate la 4 luni după terminarea încărcării cu acetat de plumb, în hepatocite nu se mai observă incluzii nucleare (fig. 2).

În citoplasma hepatocitelor se observă autolizomi de dimensiuni variate (1—3 μ) (fig. 3 şi 4), constituiţi dintr-o stromă electrondensă, fin granulară, cu zone rarefiate, electrontransparente şi cu anumite porţiuni delimitate de structuri mielinice. Aceste complexe lizozomale sînt echivalente cu corpii Dubin-Johns şi sînt formate predominant din lipofuscină, ca şi formaţiunile constituite din acumulări masive de material electrondens, cu structură pseudomembranoasă (fig. 3).

Complexele golgiene şi reticulul endoplasmic rugos sînt normale. Mitocondriile, umflate, au cristele parţial distruse, iar stroma, dilatată, ste încărcată cu un material fin granular (fig. 4). O situaţie similară a fost descrisă în ficatul porcilor intoxicaţi cu săruri de plumb : mitocondriile hepatocitelor apar dilatate, iar în stroma lor se acumulează un material fin lamelar, caracteristic proceselor degenerative (5).

Cercetarea hematopoiezei la animale intoxicate cu plumb a arătat că mitocondriile reticulocitelor sînt de asemenea dilatate şi încărcate cu fier în exces, datorită sensibilităţii acestor organite, precum şi tulburării sintezei de hemoglobină (6), (7), (8).

Celulele Kupffer sînt încărcate cu lipide peroxidate. O modalitate de protecţie a organismului faţă de intoxicaţiile cu acetat de plumb este asigurată de acţiunea apteinei şi a metilprednisonului, care diminuează funcţiile celulelor Kupffer (9). Această constatare confirmă rolul celulelor Kupffer în introducerea substanţei toxice în epiteliul hepatic.

Analiza chimică a incluziilor nucleare izolate din epiteliul renal la animale tratate cu săruri de plumb arată că aceste incluzii sînt formate dintr-un complex plumb—proteină, care conţine aproximativ 50 μg plumb/mg proteină. Compararea cantităţii de plumb concentrat în corpii nucleari ai epiteliului renal cu cantitatea de plumb rămas în rinichi arată că în

incluziile nucleare se acumulează de 60—100 de ori mai mult plumb decît în restul rinichiului (3). Această constatare sugerează că depozitarea complexului toxic plumb — proteină în nucleu, adică într-un spaţiu în care sistemele enzimatice lizozomale nu au acces, ajută la supravieţuirea celulei intoxicate.

O situaţie similară se petrece în hepatocitele şoarecilor intoxicaţi cu plumb, unde pentru un timp excesul de produse toxice cu plumb este concentrat în nuclei.

CONCLUZII

1. Dintre animalele de laborator, şoarecele este singura specie la care, în intoxicaţia cu plumb, ficatul suferă modificări comparabile cu modificările binecunoscute în rinichii tuturor acestor animale.

2. În nucleii hepatocitelor de şoarece se formează unul sau mai mulţi corpi de incluzie caracteristici pentru intoxicaţia cu plumb.

3. Nucleolii multor hepatocite apar în secţiune de forma unui manşon.

4. În citoplasma hepatocitelor se observă numeroşi corpi pigmentari, constituiţi din lipide peroxidate de tipul lipofuscinelor; mitocondriile apar dilatate şi cu stroma încărcată cu un detritus fin granular.

5. După 120 de zile de la realizarea încărcării cu plumb, incluziile nucleare dispar, iar forma nucleolilor revine la normal, în timp ce leziunile din citoplasma hepatocitelor persistă.

Prezentat la redacţie
la 12 iunie 1984

Institutul de ştiinţe biologice,
Laboratorul de imunochimie,
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

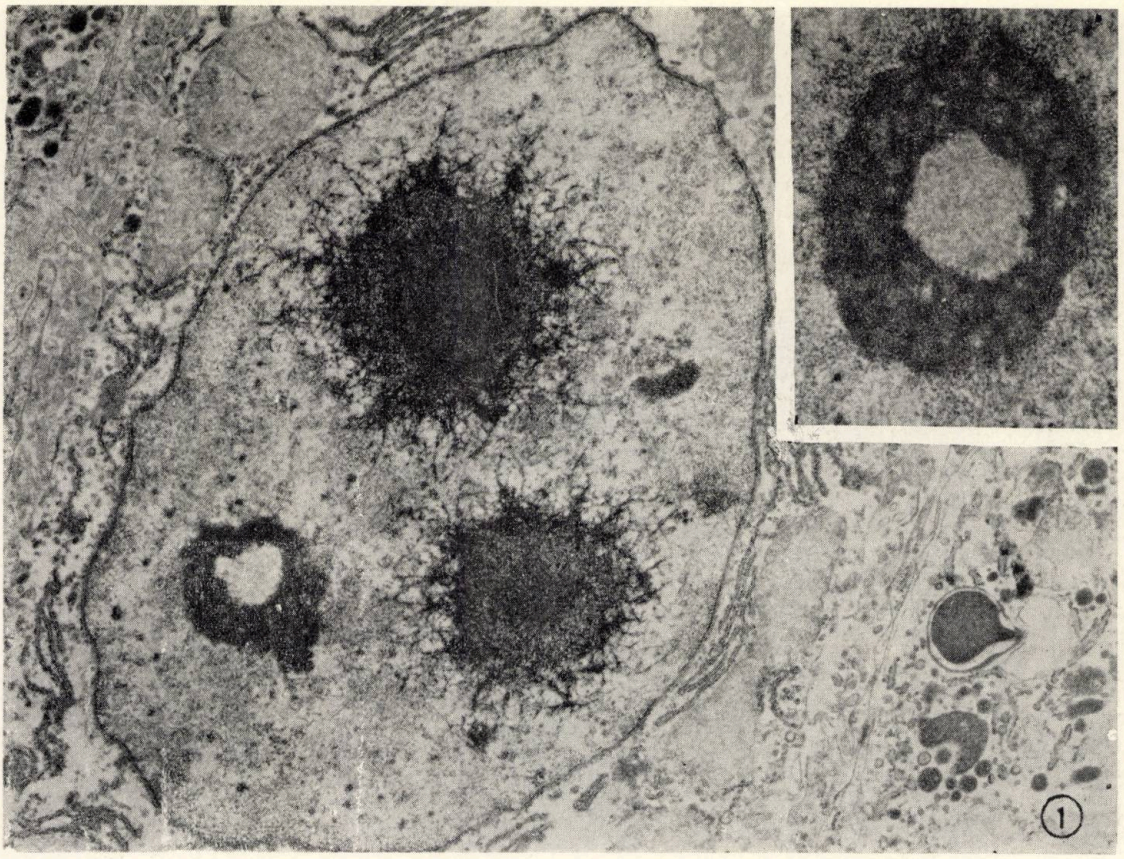
INTRANUCLEAR INCLUSION BODIES AND CYTOPLASMIC INJURIES OF THE HEPATOCYTES IN LEAD-POISONED MICE

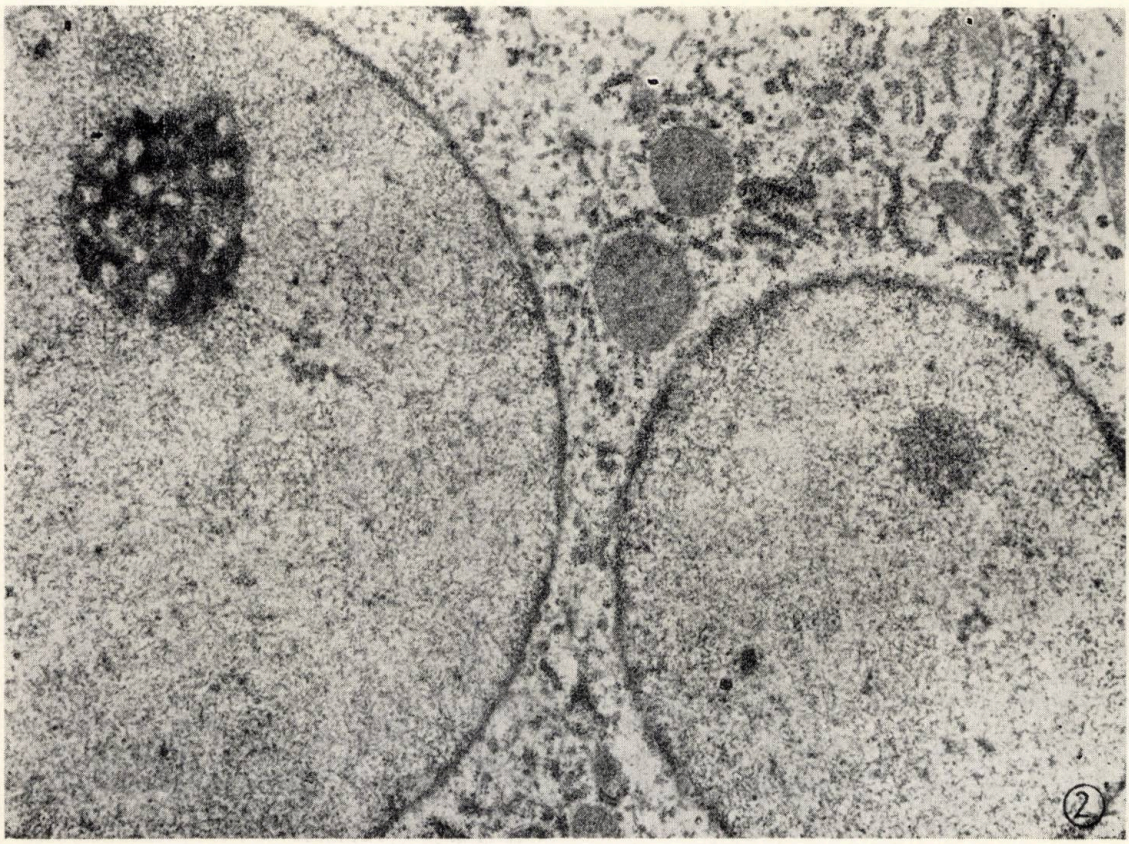
Intraperitoneal inoculation of the lead acetate is followed by the appearance in hepatocytes of intranuclear inclusion bodies similar to intranuclear inclusion bodies of the renal tubular cells known to be formed after lead poisoning.

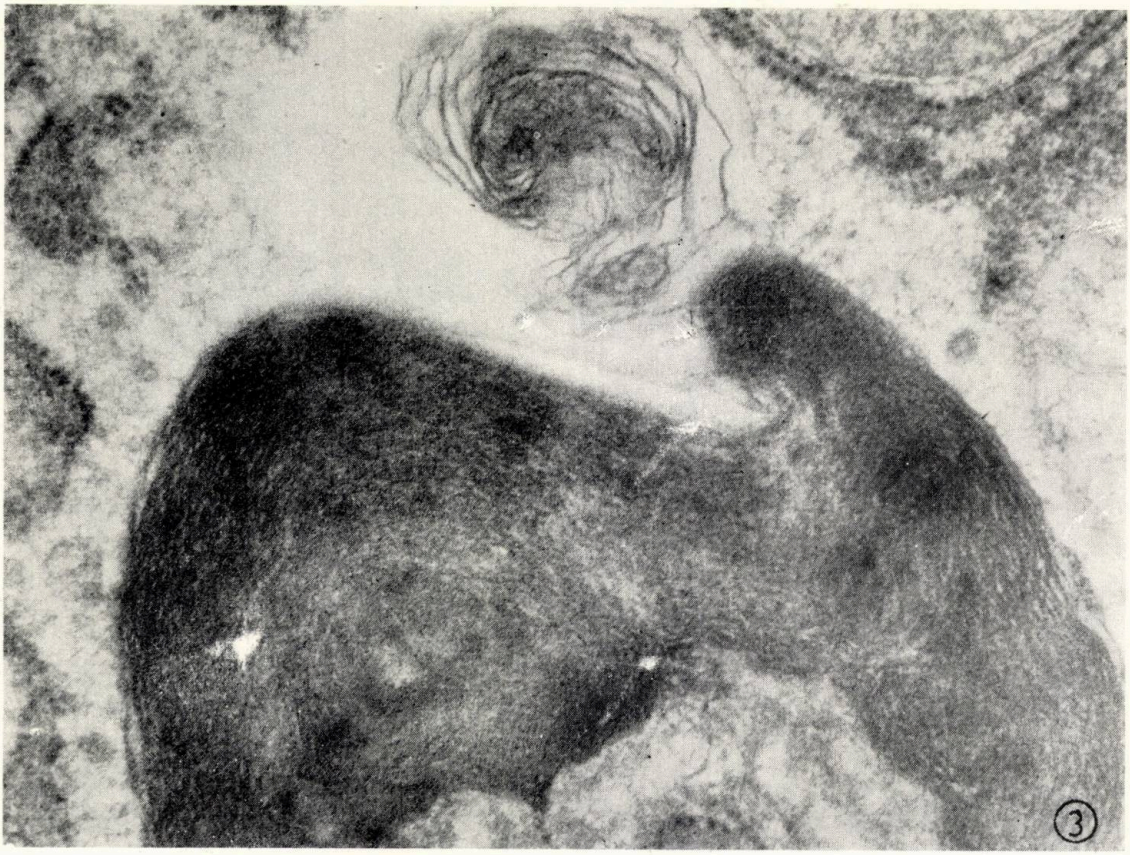
In the cytoplasm of hepatocytes there is a large amount of autolysomes containing peroxidized lipids and various mielin-like structures.

Fig. 1. — Şoarece sacrificat la 2 zile de la sfîrşitul tratamentului cu acetat de plumb, detaliu dintr-un hepatocit. În nucleu se observă doi corpi de incluzie constituiţi din filamente electronopace şi nucleolul dilatat, avînd forma unui manşon (10 000 ×). Insert : alt nucleol (20 000×).

Fig. 2. — Şoarece sacrificat la 120 de zile de la sfîrşitul tratamentului cu acetat de plumb, detaliu dintr-un hepatocit binucleat. Se remarcă lipsa corpilor de incluzie din nucleu şi revenirea nucleolului la structura normală (18 000 ×).


1


2


3

4

Mitochondria are swollen and present degenerative features. All these modifications in the nucleus and the cytoplasm of hepatocytes seem to be reversible.

BIBLIOGRAFIE

1. D. L. BEAVER, Amer. J. Path., **39**, 195 (1961).
2. J. M. ANGEVINE, A. KAPPAS, R. L. de GOWIN, B. H. SPARGO, Arch. Path., **73**, 486 (1962).
3. R. A. GOYER, D. LEONARD, J. F. MOORE, B. RHYNE, M. R. KRIGMAN, Arch. environ. Hlth, **20**, 705 (1970).
4. E. MUREŞAN, A. T. BOGDAN, M. GABOREANU, A. I. BABA, *Tehnici de histochimie normală şi patologică*, Edit. Ceres, Bucureşti, 1976, p. 96.
5. A. M. WATRACH, J. ultrastr. Res., **10**, 177 (1964).
6. M. C. BESSIS, W. N. JENSEN, Brit. J. Haemat., **11**, 49 (1965).
7. C. H. SIMPSON, Amer. J. Vet. Res., **31**, 515 (1970).
8. D. G. KHACHIROV, A. I. GRACHEEVA, Gig. Tr. Prof. Zabol., **2**, 51 (1975).
9. J. A. COOK, N. R. KILUZIO, Exp. mol. Path., **19**, 127 (1973).

Fig. 3. — Şoarece sacrificat la 2 zile de la sfîrşitul tratamentului cu acetat de plumb, detaliu dintr-o structură complexă asemănătoare mielinei (66 000 ×).

Fig. 4. — Şoarece sacrificat la 120 de zile de la sfîrşitul tratamentului cu acetat de plumb, detaliu din citoplasmă. Se remarcă mitocondrii hipertrofiate şi corpi Dubin-Johns (58 000 ×).

EXISTĂ DIFERENȚE ÎNTRE MODUL DE DEGRADARE PRIN PROTEOLIZĂ AL RN-AZELOR CU (RN-AZA B) ȘI FĂRĂ PARTE GLUCIDICĂ (RN-AZA A)?

LOUIS KAMEL TADROS*, S.A. HULEA**, CECILIA MOTAȘ**

Rezumat. RN-azele pancreatice A și B au fost supuse digestiei cu pepsină la timpi diferiți, urmată de tripsinoliză. Activitatea reziduală a RN-azelor după proteoliză a fost determinată cantitativ prin metoda spectrofotometrică și calitativ prin electroforeză în gel de poliacrilamidă. Digestia cu pepsină duce la o inactivare mai rapidă a RN-azei A decît a RN-azei B. Diferențe marcante la proteoliza celor două RN-aze se constată după timpi de incubare cu această enzimă pînă la 30 min. Rezultate similare se înregistrează și dacă pepsinoliza timp de 30 min este urmată de tripsinoliză. Astfel, în primele 30 min de pepsinoliză, RN-aza A suferă modificări conformaționale în așa fel încît, prin incubare ulterioară cu tripsină, activitatea enzimei este parțial refăcută. În schimb, pepsinoliza RN-azei B timp de 30 min, urmată de tripsinoliză, nu modifică semnificativ activitatea enzimatică, dar enzima este mai ușor atacată de tripsină dacă incubarea inițială cu pepsină depășește o oră. Rezultatele noastre sugerează faptul că prezența lanțului glucidic din RN-aza B face ca această enzimă să se comporte diferit față de RN-aza A atît la pepsinoliză cît și la tripsinoliza ulterioară, dovedind implicarea părții glucidice în procesul de degradare.

RN-aza pancreatică A constituie un excelent material de studiu privind relația structură—funcție la enzime, datorită cunoașterii structurii sale complete.

Este bine cunoscută rezistența RN-azei A la digestia triptică (1), (2), dar se știe că enzima poate fi clivată în puncte specifice din regiunea N-terminală de subtilizină (3), (4) și elastază (5), (6). RN-aza A poate fi clivată și de pepsină în regiunea C-terminală, rezultînd într-o primă fază un tetrapeptid și un polipeptid inactiv enzimatic cu 120 de resturi de aminoacizi (7), (8), (9), (10), (11). Prin incubare cu pepsină la pH 3,5, RN-aza A își pierde circa 85% din activitate în 3 ore (7).

S-a mai demonstrat prezența în pancreas, pe lîngă RN-aza A, și a RN-azelor B (12), (13), C și D (14). S-a constatat că toate au aceeași activitate specifică, aceeași compoziție în aminoacizi și aceeași structură terțiară, deosebindu-se de RN-aza A prin faptul că toate trei sînt glicozilate la asparagina din poziția 34 (14), (15). RN-aza B conține două resturi de N-acetilglucozamină și șase resturi de manoză (13), (16), (17), (18), iar RN-azele C și D au lanțuri oligozaharidice de tip complex (14).

Studiile lui Klee (5) au demonstrat sensibilitatea față de tripsină a RN-azei A tratată cu elastază, deci clivată în regiunea N-terminală. Avînd în vedere acest fapt, ne-am propus să cercetăm comportarea la tripsinoliză a preparatelor RN-azice A și B tratate anterior cu pepsină, deci clivate în regiunea C-terminală.

Deoarece ambele enzime au aceeaşi structură primară şi terţiară, am avut un model ideal pentru studiul rolului jucat de partea glucidică în timpul proteolizei RN-azelor pancreatice A şi B care au fost supuse digestiei cu pepsină diferite perioade de timp, după care au fost tratate cu tripsină timp de 30 min sau 60 min.

MATERIALE ŞI METODE

RN-azele pancreatice folosite în acest studiu au fost obţinute din surse comerciale, şi anume RN-aza A de la Koch-Light Labs. U.K., RN-aza B (tip XII B) de la Sigma Chemical Comp. SUA, iar ARN din drojdie, pepsina şi tripsina (de două ori cristalizată) au provenit de la Serva, R.F.G. Restul reactivilor au fost de puritate analitică şi obţinuţi pe cale comercială.

Activitatea RN-azică s-a determinat prin metoda spectrofotometrică (19) folosind ARN ca substrat şi s-a exprimat în unităţi de absorbţie la 260 nm.

Electroforeza proteinelor în gel de poliacrilamidă la pH acid s-a efectuat conform tehnicii lui McAllister şi colab. (20), iar detecţia activităţii RN-azice după electroforeza în gel s-a făcut după cum s-a arătat într-o lucrare anterioară (21).

Tratarea RN-azelor A şi B cu tripsină s-a efectuat conform schemei date de Klee (5). Enzimele, în cantitate de 120 μg, au fost dizolvate în 0,15 ml tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 şi tratate cu 5 μl tripsină (48 μg) în 0,01 N HCl, după care au fost incubate 0, 30 şi 60 min la 37°C.

Degradarea RN-azelor A şi B cu pepsină s-a efectuat conform indicaţiilor date de Anfinsen (7). RN-azele A şi B, în cantitate de 600 μg, au fost dizolvate în 0,3 ml HCl 0,01 N, pH 1,8 şi tratate cu 20 μl HCl 0,01 N, pH 1,8, care conţinea 1,3 μg pepsină. Probele au fost incubate 0, 15, 30, 60, 120 şi 180 min la 37°C, după care reacţia a fost oprită prin adăugarea a 0,1 ml tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0.

Degradarea RN-azelor A şi B cu pepsină urmată de tripsină s-a făcut prin incubarea a 0,25 ml din amestecul RN-ază—pepsină menţionat cu 0,2 ml tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 şi cu 5 μl tripsină (48 μg) în HCl 0,01 N timp de 0, 30 şi 60 min la 37°C. Toate probele de la hidrolizele proteolitice au fost păstrate la —15°C înainte de a fi analizate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Caracterizarea enzimelor s-a făcut prin determinarea activităţii enzimatice (metoda spectrofotometrică) şi prin întrebuinţarea metodei disc-electroforezei pentru evidenţierea comportării la proteoliză (colorarea gelurilor pentru proteină şi pentru activitate enzimatică).

INCUBAREA RN-AZELOR A ŞI B CU TRIPSINĂ

Rezultatele de la incubarea cu tripsină sînt prezentate în tabelele 1 pentru RN-aza A şi 2 pentru RN-aza B. Se constată cunoscuta rezistenţă la tripsină a RN-azei A, dar şi a RN-azei B. Totodată, este de semnalat uşoara creştere a activităţii la toate probele incubate, faţă de probele de la timpul 0. O creştere asemănătoare este prezentă şi la probele lui Klee (5).

INCUBAREA RN-AZELOR A ŞI B CU PEPSINĂ

Rezultatele sînt prezentate în figura 1. RN-aza A (fig. 1, A) îşi pierde aproape 70% din activitate după 3 ore de pepsinoliză, în timp ce RN-aza B numai 45% din activitate (fig. 1, B). Variaţia activităţii

Tabela 1

Activitatea RN-azei A incubate cu tripsină

Timp de incubare (min)	Activitate (E_{260})
0	0,659
2,5	0,684
5	0,666
10	0,709
15	0,674
20	0,674
25	0,694
30	0,710
60	0,685

Tabela 2

Activitatea RN-azei B incubate cu tripsină

Timp de incubare (min)	Activitate (E_{260})
0	0,610
2,5	0,615
5	0,615
10	0,625
15	0,634
20	0,662
25	0,634
30	0,595
60	0,598

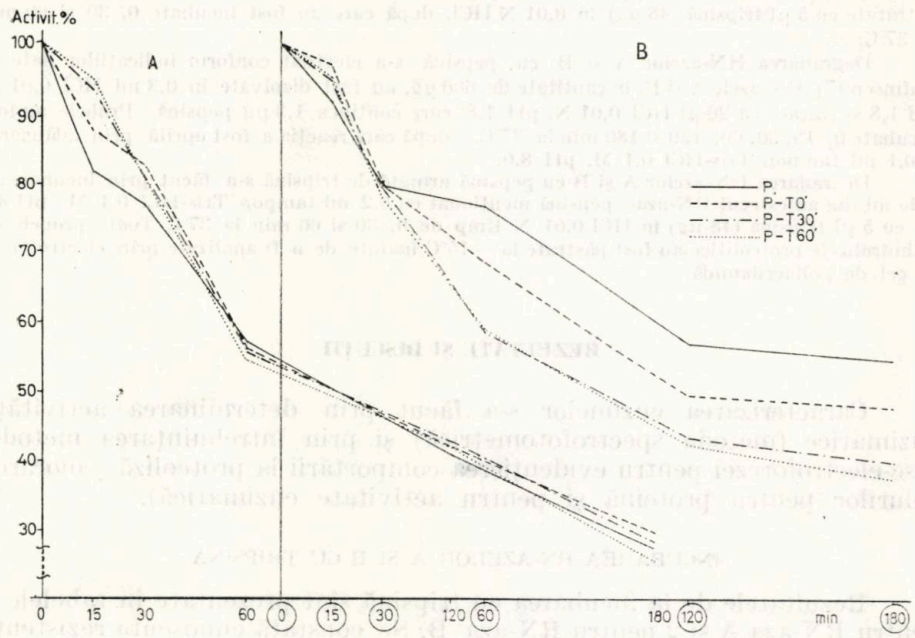


Fig. 1. — Activitatea probelor conţinînd RN-ază A şi B tratate cu pepsină şi incubate cu tripsină pentru 0, 30 şi 60 min.

enzimelor în timpul pepsinolizei sugerează prezenţa a două componente active. Preparatele de RN-aze A şi B cu care am lucrat sînt impurificate reciproc (17), RN-aza B conţinînd aproape 50% RN-ază A.

Analiza prin electroforeză în gel de PAA a probelor de RN-ază A tratate cu pepsină arată apariţia unei benzi proteice cu viteză de migrare mai mare după o oră de incubare (fig. 2, b), care se accentuează la 2 şi 3 ore. Totodată se remarcă întinderea benzii proteice după 15 min (fig.2, a).

Detecţia activităţii enzimatice după electroforeza în gel arată că fragmentul proteic cu viteză mai mare de migrare (fig. 2, b) este activ enzimatic, fapt ce nu confirmă rezultatele lui Anfinsen (7) (pl. I, 1).

Prezenţa unei activităţi RN-azice aproape de start poate fi atribuită urmelor de RN-ază C şi D în preparatul de RN-ază A (14), migrarea lor în gel fiind asemănătoare celei menţionate de Baynes şi Wald (17).

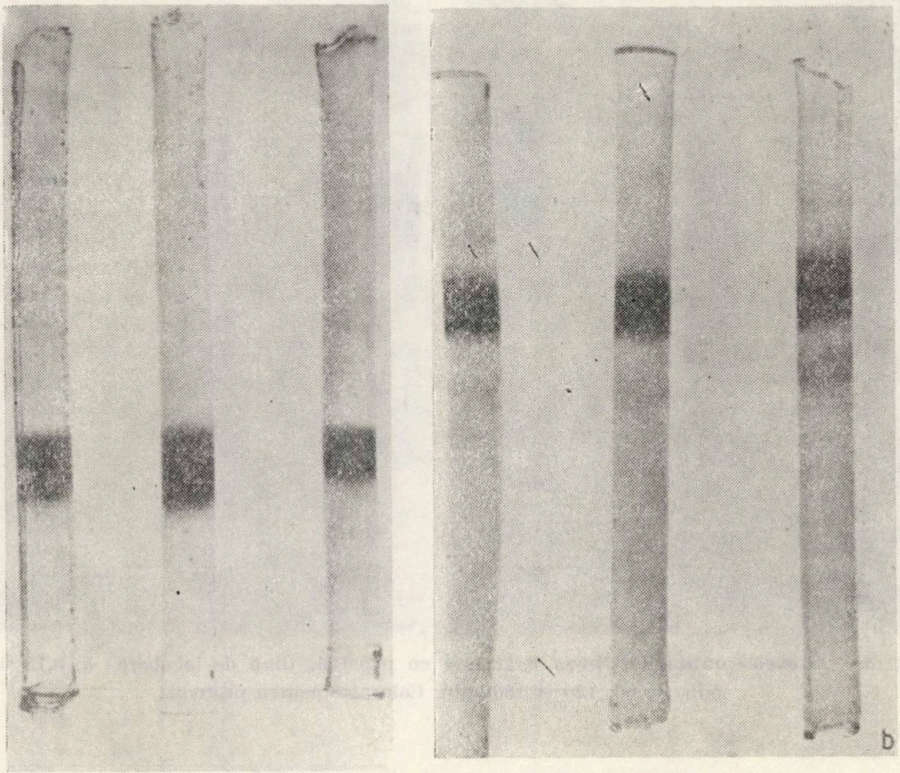


Fig. 2. — Probele conţinînd RN-ază A tratate cu pepsină, timp de incubare: *a*, 0, 15 şi 30 min; *b*, 60, 120 şi 180 min. Coloraţie pentru proteină.

RN-aza B tratată în mod similar cu pepsină se comportă la electroforeză în gel atît ca proteină (fig. 3, a şi b) cît şi ca activitate (pl. I, 2), asemănător cu RN-aza A. Se constată apariţia unui fragment activ enzimatic după o oră de incubare (fig. 3, b şi pl. I, 2), dar nu se observă alte modificări în grosimea şi mobilitatea benzilor RN-azei B (fig. 3, a şi b).

Din figura 3, a şi b reiese prezenţa celor două benzi proteice atribuite RN-azelor A şi B din preparatul de RN-ază B (Sigma), RN-aza B avînd o viteză de migrare ceva mai lentă decît RN-aza A. Comparînd probele de la RN-azele A şi B migrate în gel, nu se poate evidenţia nici la colorarea pentru proteine şi nici la colorarea pentru activitate rezistenţa mare a RN-azei B la acţiunea pepsinei. Fragmentul cu activitate enzimatică apare la o oră de incubare şi se menţine activ pînă la 3 ore.

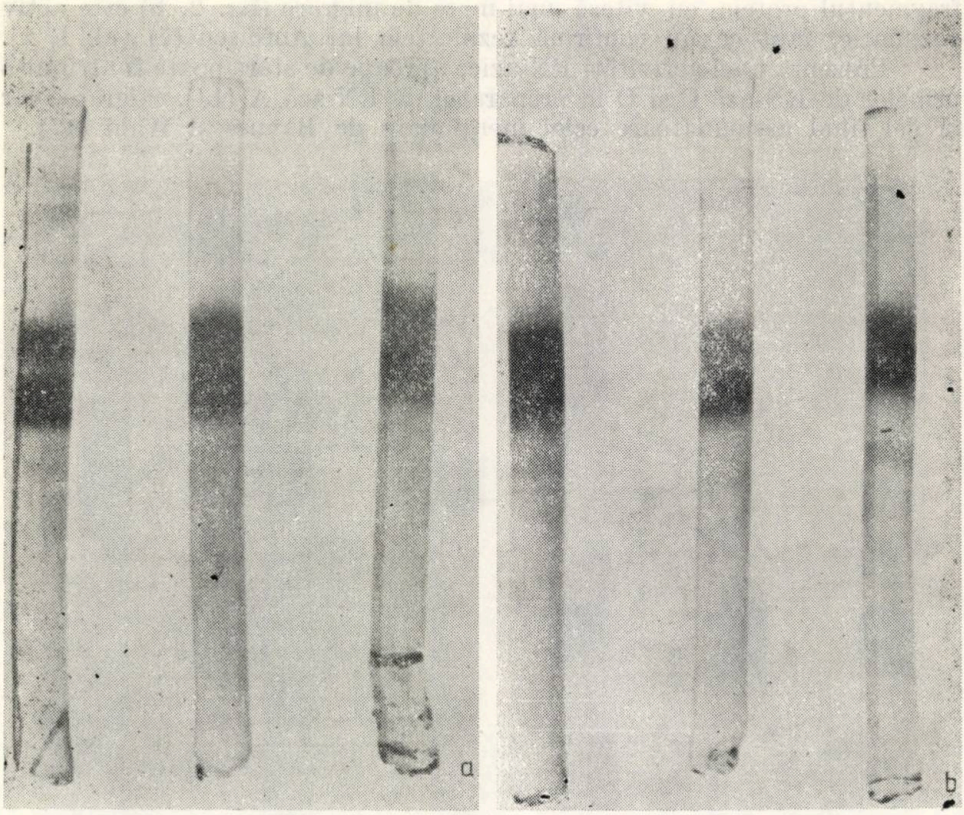


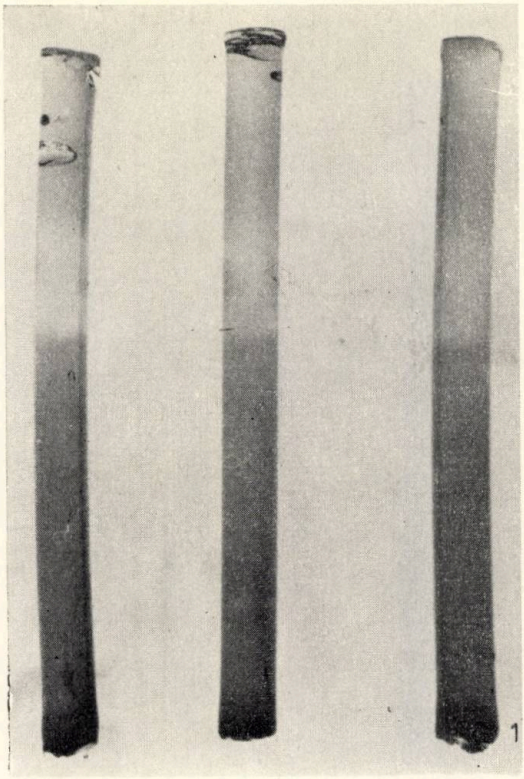
Fig. 3. — Probele conţinînd RN-aza B tratate cu pepsină, timp de incubare: *a*, 0,15 şi 30 min; *b*, 60, 120 şi 180 min. Coloraţie pentru proteină.

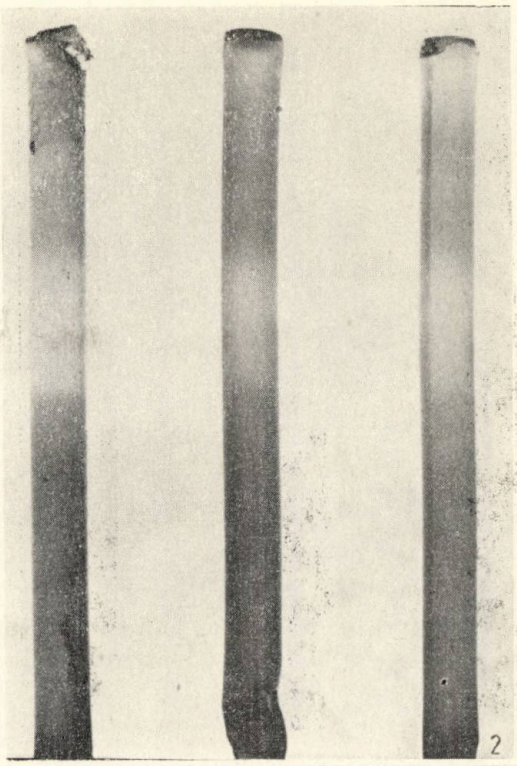
INCUBAREA RN-AZELOR A şi B CU PEPSINĂ ŞI TRIPSINĂ

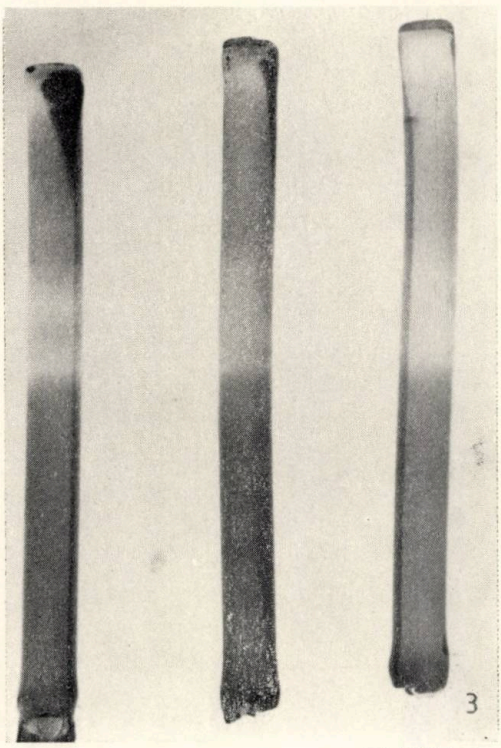
Deoarece cantitatea de tripsină întrebuinţată era mare (raportul 1/2, 5), am folosit o serie de martori cu adăugarea de tripsină şi inactivare imediată (0 min), în sensul nemodificării pH-ului acid de la pepsină înainte de adăugarea tripsinei.

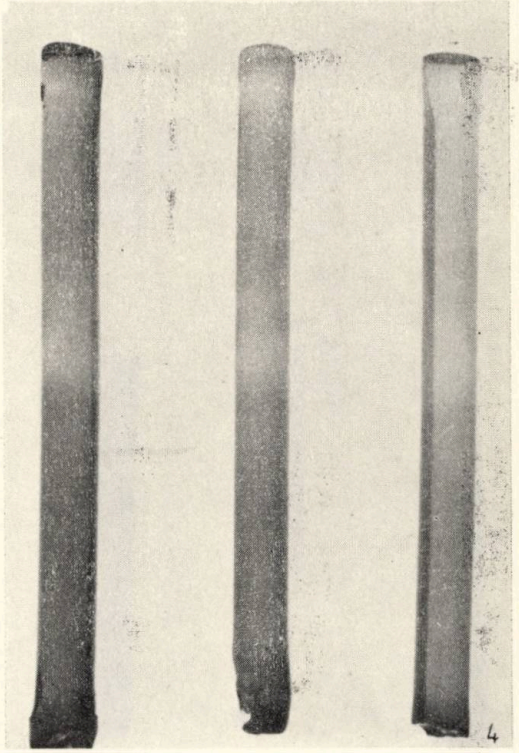
Activitatea RN-azelor A şi B după incubare cu pepsină şi adăugarea tripsinei 0 min. După cum reiese din figura 1, A, activitatea RN-azei A creşte după 15 şi 30 min de tratare cu pepsină în prezenţa tripsinei la timpul 0, comparativ cu activitatea probelor la aceleaşi intervale de timp, fără tripsină. După 30 min însă, aspectul curbei este similar cu cel al curbei probelor fără tripsină, ele practic suprapunîndu-se. S-ar fi putut ca preparatul de tripsină să conţină RN-ază.

Comportarea RN-azei B tratate aşa cum s-a arătat infirmă supoziţia prezenţei RN-azei în preparatul de tripsină deoarece activitatea RN-azei B a crescut numai cu 5% doar în primele 15 min, fiind egală la 30 min şi apoi scăzînd constant cu 8% faţă de activitatea probelor fără tripsină









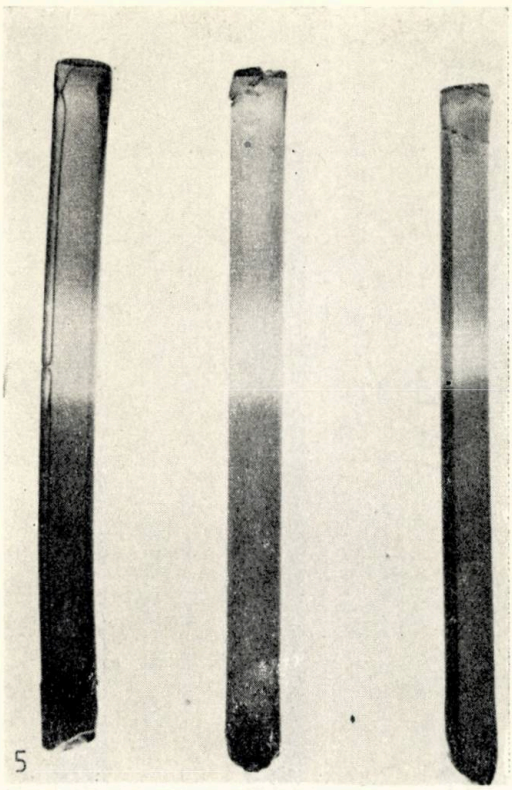
PLANȘA I. Activitatea enzimatică.

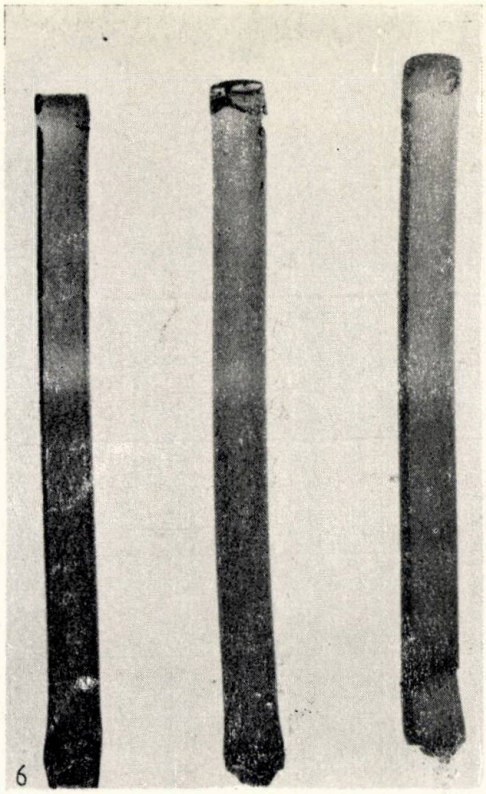
Fig. 1. — Probele conținînd RN-ază A tratate cu pepsină, timp de incubare 60, 120 și 180 min. Colorație pentru activitate.

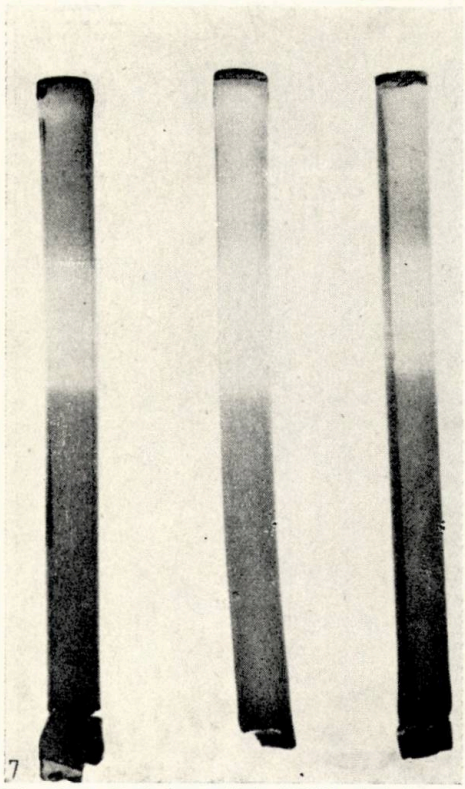
Fig. 2. — Probele conținînd RN-ază B tratate cu pepsină, timp de incubare 60, 120 și 180 min. Colorație pentru activitate.

Fig. 3. — Probele conținînd RN-ază A incubate cu pepsină 0, 15 și 30 min și tratate cu tripsină 0 min. Colorație pentru activitate.

Fig. 4. — Probele conținînd RN-ază A incubate cu pepsină 60, 120 și 180 min și tratate cu tripsină 0 min. Colorație pentru activitate.







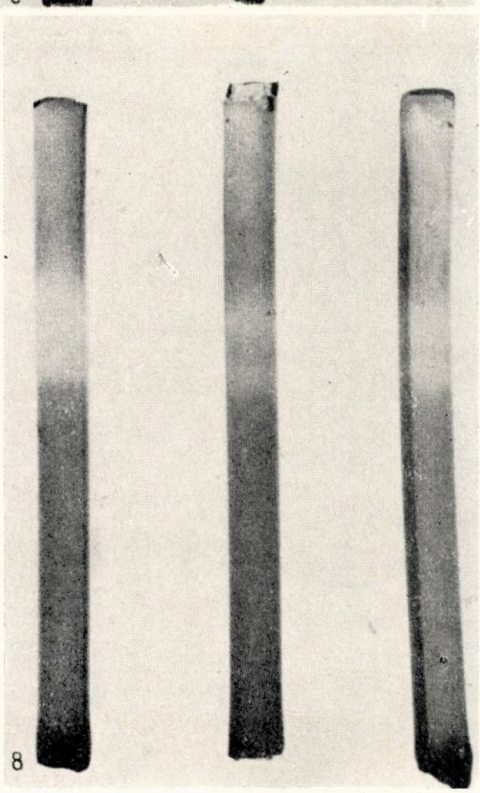


Fig. 5. — Probele conținînd RN-ază A incubate cu pepsină 0, 15 și 30 min și tratate cu tripsină 30 min. Colorație pentru activitate.

Fig. 6. — Probele conținînd RN-ază A incubate cu pepsină 60, 120 și 180 min și tratate cu tripsină 30 min. Colorație pentru activitate.

Fig. 7. — Probele conținînd RN-ază B incubate cu pepsină 0, 15 și 30 min și tratate cu tripsină 30 min. Colorație pentru activitate.

Fig. 8. — Probele conținînd RN-ază B incubate cu pepsină 60, 120 și 180 min și tratate cu tripsină 30 min. Colorație pentru activitate.

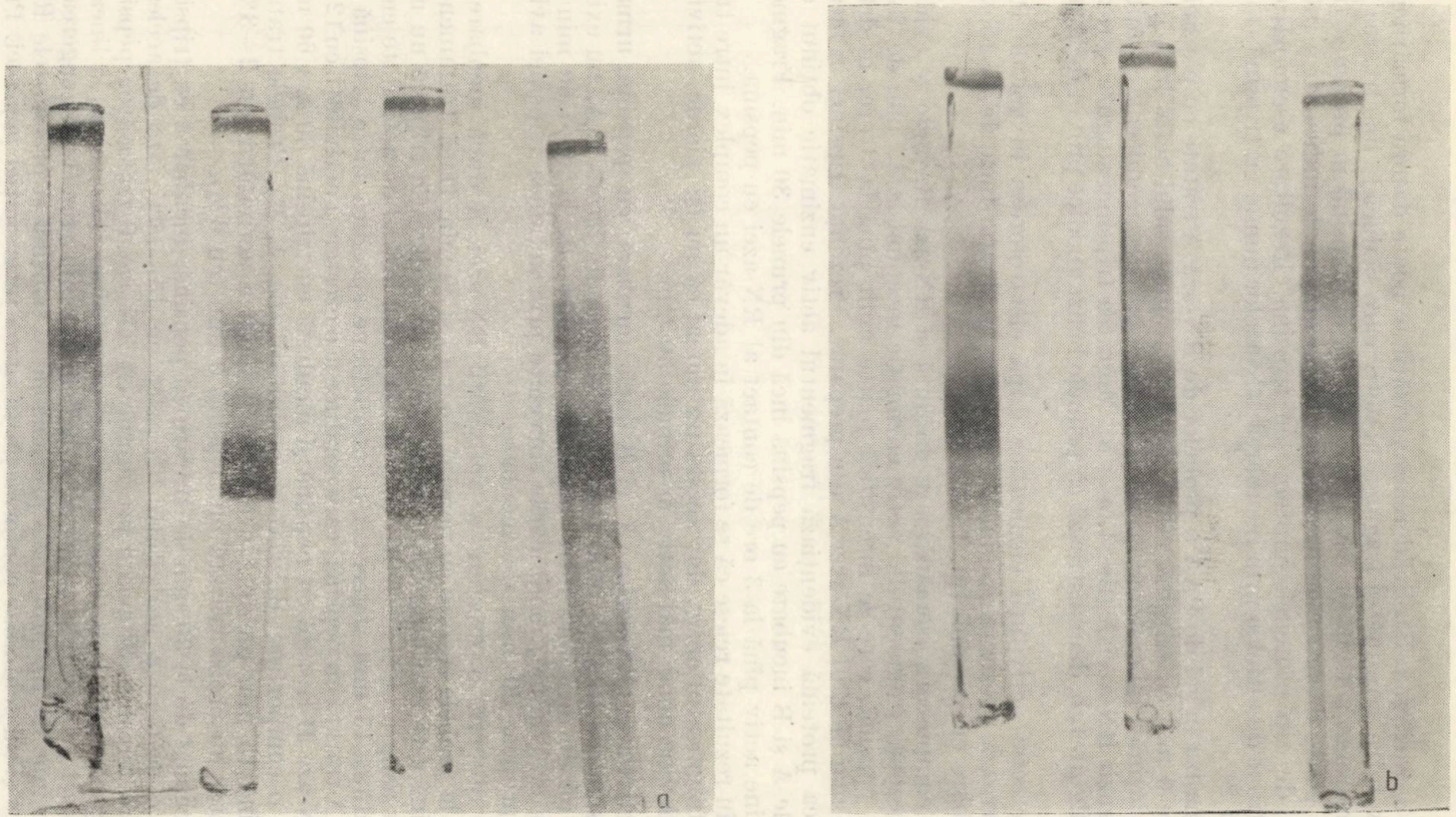


Fig. 4. — *a*, Probele conţinînd RN-ază A incubate cu pepsină 0, 15 şi 30 min şi tratate cu tripsină 0 min. Primul gel — proba de tripsină singură. *b*, Probele conţinînd RN-ază A incubate cu pepsină 60, 120 şi 180 min şi tratate cu tripsină 0 min. Colorație pentru proteină.

pînă la 3 ore (fig. 1, B). Scăderea activităţii se poate datora formării unui complex între tripsină şi fragmentul activ care să ducă la inactivarea lui.

Creşterea activităţii RN-azelor tratate cu pepsină în prezenţa tripsinei se poate datora modificărilor lor conformaţionale induse de o interacţiune de tip proteină—proteină cu tripsina. Rezultate asemănătoare s-au obţinut de altfel şi prin incubarea RN-azelor numai cu tripsină (tabelele 1 şi 2).

Analiza în gel de PAA a probelor de RN-ază A tratate cu pepsină şi incubate 0 min cu tripsină arată prezenţa fragmentului activ încă de la 15 min, lăţimea lui crescînd cu timpul de incubare, concomitent cu micşorarea benzii RN-azei A (fig. 4, a şi b). Migrarea tripsinei singure, prezentată în figura 4, b, demonstrează că primele benzi anodice provin de la tripsină.

Detecţia activităţii enzimatice după electroforeza în gel de PAA demonstrează prezenţa fragmentului activ enzimatic încă de la 15 min de incubare cu pepsină (pl. I, 3 şi 4).

O comportare asemănătoare prezintă şi RN-aza B, unde se evidenţiază prezenţa fragmentului activ enzimatic începînd la 15 min de incubare cu pepsină, care se intensifică foarte mult pînă la 3 ore, în detrimentul, mai ales, al RN-azei A din preparat. Prezenţa tripsinei în mediu numai ca proteină evidenţiază fragmentul activ enzimatic obţinut din RN-azele A şi B incubate cu pepsină încă din primele 30 min. Fragmentul rămîne activ pînă la 3 ore de contact al RN-azei cu pepsina.

Din rezultate reiese că se formează în adevăr un complex între tripsină şi fragmentul activ, dar acesta nu numai că nu îşi pierde activitatea, ci devine chiar mai activ în primele 30 min.

Activitatea RN-azelor A şi B după incubare cu pepsină, urmată de tripsinoliză 30 şi 60 min. După cum se vede din figura 1, A, nu există nici un fel de deosebire între aspectul curbelor de la 30 şi 60 min de incubare cu tripsină, modificările survenite prin acţiunea tripsinei avînd loc în primele 30 min de incubare.

Se observă o creştere a activităţii RN-azei A după incubare cu tripsină la probele tratate cu pepsină doar 15 şi 30 min. Dacă tratamentul cu pepsină este mai lung de 30 min, următoarea digestie triptică nu mai are efect asupra activităţii RN-azei A. Aspectul curbei de activitate enzimatică după 15 min sugerează o interacţiune specifică între tripsină şi RN-aza A tratată cu pepsină, care conduce la o creştere a activităţii cu 12%.

RN-aza B tratată cu pepsină şi incubată cu tripsină 30 sau 60 min prezintă o comportare diferită a activităţii (fig. 1, B). Probele tratate cu pepsină 15 min prezintă o creştere minoră a activităţii (cu 2—3%), asemănător cu proba tratată cu tripsină 0 min (cu 6%).

Începînd de la 30 min de tratare cu pepsină, incubarea cu tripsină duce la o scădere a activităţii RN-azice cu 15—18% faţă de aceleaşi probe fără tripsină. Se poate presupune că RN-aza B tratată cu pepsină devine susceptibilă la acţiunea ulterioară a tripsinei. Dar scăderea lineară a activităţii prin simpla adăugare a tripsinei 0 min (fig. 1, B) sugerează o interacţiune de tip proteină—proteină între tripsină şi preparatele RN-azice care şi-au schimbat conformaţia în urma intervenţiei pepsinei. Prin această interacţiune se modifică centrul activ al RN-azei, în sensul scăderii

activităţii. Cu toate că în probă există RN-azele A şi B (17), modificările au loc numai la nivelul RN-azei B, deoarece RN-aza A singură, în aceleaşi condiţii, nu este influenţată de tripsină (fig. 1, A). Dar, chiar prin intervenţia ulterioară a tripsinei, procentul activităţii pierdute de RN-aza B degradată de pepsină este mai mic decît al RN-azei A, aşa cum reiese din compararea figurii 1,A cu figura 1,B.

Electroforeza în gel de PAA poate lămuri deosebirile de comportare a RN-azelor A şi B la acţiunea tripsinei.

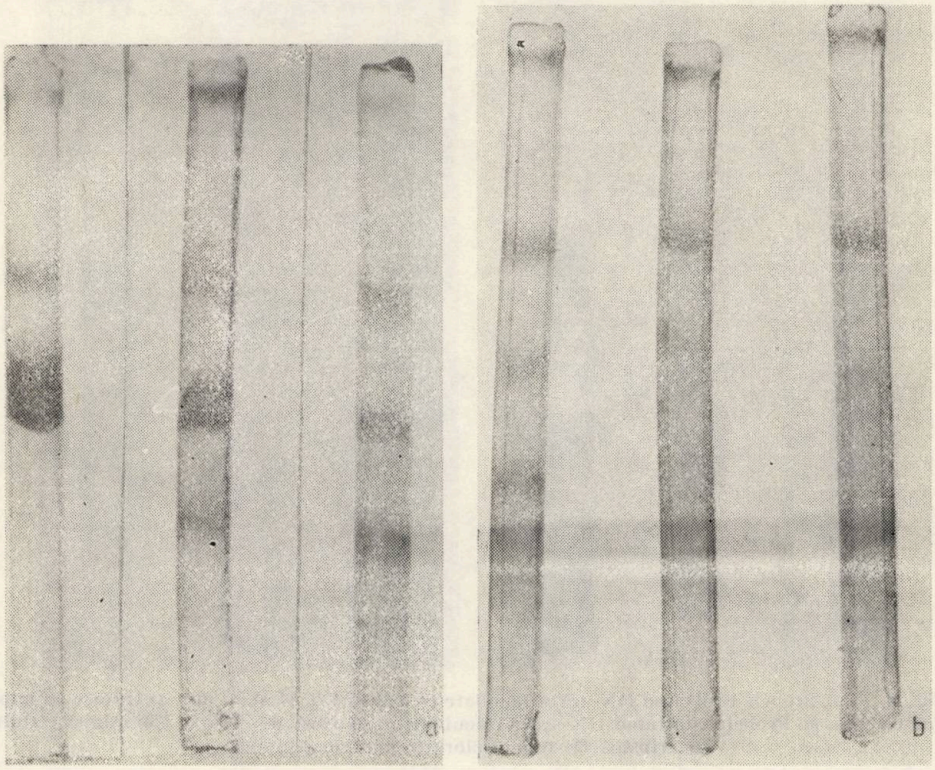


Fig. 5.—*a*, Probele conţinînd RN-ază A incubate cu pepsină 0, 15 şi 30 min şi tratate cu tripsină 30 min. *b*, Probele conţinînd RN-ază A incubate cu pepsină 60, 120 şi 180 min şi tratate cu tripsină 30 min. Coloraţie pentru proteină.

RN-aza A incubată cu tripsină 30 sau 60 min ulterior acţiunii pepsinei prezintă, după colorarea pentru proteine, migrările din figura 5, a şi b la 30 min şi migrările din figura 6, a şi b la 60 min.

Detecţia activităţii enzimatice după migrarea în gel (pl. I, 5 şi 6) arată că fragmentul scindat după 15 şi 30 min de acţiune a pepsinei (fig. 5, a) este activ enzimatic (pl. I, 5), pentru ca la o oră de incubare cu pepsină să fie scindat de către tripsină în trei fragmente (fig. 5, b), care nu mai prezintă activitate enzimatică (pl. I, 6). Reducerea benzii proteice (fig. 5) în timp decurge paralel cu reducerea activităţii enzimatice (pl. I, 5 şi 6). Şi la aceste probe este de remarcat prezenţa celor două benzi proteice ale tripsinei.

Incubarea prelungită, de o oră, cu tripsină modifică vitezele de migrare ale RN-azei A (fig. 6), intensitatea benzilor scăzînd puternic concomitent cu activitatea.

RN-aza B incubată cu tripsină 30 (fig. 7, a şi b; pl. I, 7 şi 8) sau 60 min ulterior acţiunii pepsinei se comportă similar cu RN-aza A; fragmentul scindat după 15 şi 30 min de acţiune a pepsinei (fig. 7, a) este

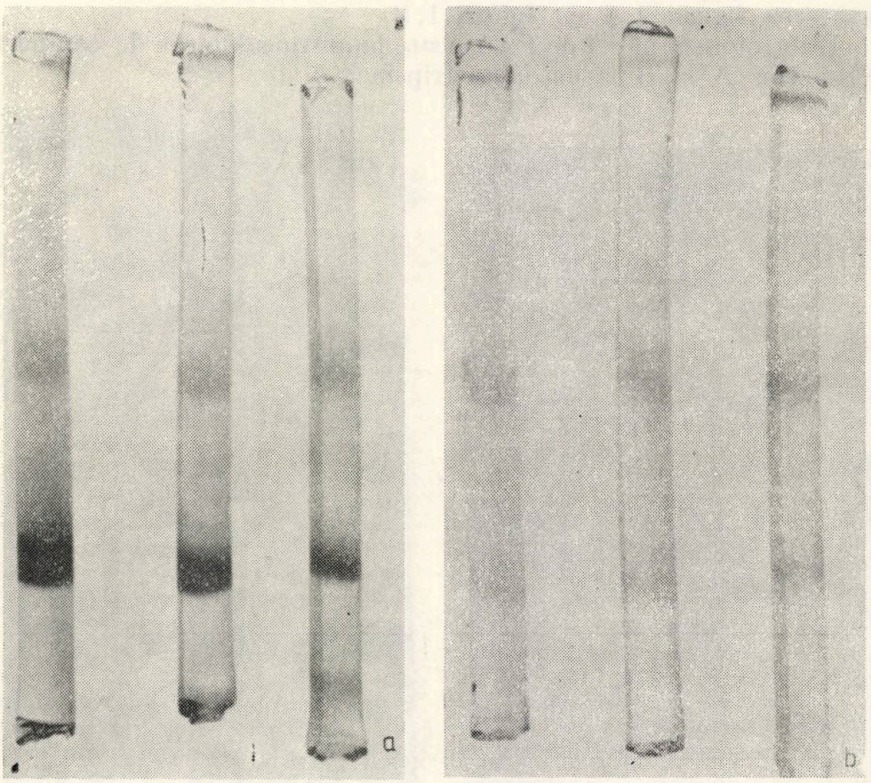


Fig. 6. — *a*, Probele conţinînd RN-ază A incubate cu pepsină 0, 15 şi 30 min şi tratate cu tripsină 60 min. *b*, Probele conţinînd RN-ază A incubate cu pepsină 60, 120 şi 180 min şi tratate cu tripsină 60 min. Coloraţie pentru proteină.

activ enzimatic (pl. I, 7), scindîndu-se de la o oră de incubare cu pepsină în trei fragmente (fig. 7, b) inactive (pl. I, 8).

Cele două benzi proteice ale RN-azelor A şi B se reduc considerabil în timp, cu menţinerea RN-azei A şi dispariţia aproape totală a RN-azei B. Activitatea enzimatică scade în timp, dar rămîne destul de puternic evidenţiată şi după o oră de acţiune a pepsinei, fiind prezentă şi pe banda proteică foarte slabă a RN-azei B.

Incubarea de o oră cu tripsină accelerează vitezele de migrare şi ale RN-azei B, intensitatea benzilor scăzînd puternic concomitent cu activitatea.

Rezultatele sînt în concordanţă cu cele prezentate de Ginsburg şi Schachman (22), care demonstrează că pepsina scindează mai mult decît o singură legătură peptidică la aminoacizii 120—121 (7), foarte strict

dependent de condiţiile experimentale. Autorii detectează activitate enzimatică şi la moleculele de greutăţi moleculare mai mici, obţinute prin pepsinoliză, cu scăderea lentă a activităţii în timp, în funcţie lineară de numărul de legături hidrolizate/moleculă. Aceste date nu confirmă pe cele prezentate de Anfinsen (7) asupra completei inactivări prin scindarea unei singure legături peptidice cu eliberarea tetrapeptidului C-terminal.

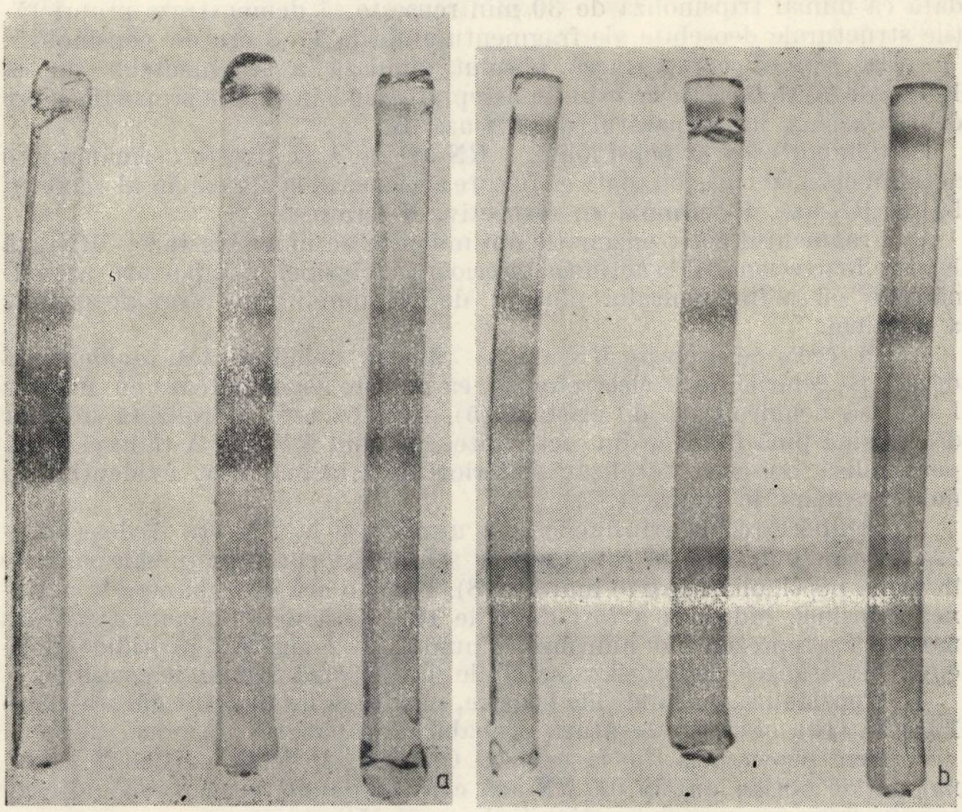


Fig. 7. — *a*, Probele conţinînd RN-ază B incubate cu pepsină 0, 15 şi 30 min şi tratate cu tripsină 30 min. *b*, Probele conţinînd RN-ază B incubate cu pepsină 60, 120 şi 180 min şi tratate cu tripsină 30 min. Coloraţie pentru proteină.

Rezultatele noastre de la electroforeza în gel de PAA indică clar existenţa unui fragment activ enzimatic cu greutate moleculară mai mică, care este scindat în fragmente şi mai mici, inactive, prin acţiunea tripsinei începînd de la probele incubate 60 min cu pepsină. Se dovedeşte că fragmentul activ enzimatic de la probele de RN-ază A şi B incubate 15 şi 30 min cu pepsină este diferit de cel de la 60—180 min, avînd în vedere comportarea lui deosebită la aceeaşi acţiune ulterioară a tripsinei de 30 min. Deosebirile sînt şi de ordin calitativ, nu numai de ordin cantitativ, aşa cum reiese din figurile 5, a şi b şi 7, a şi b. Modificările cantitative sînt evidente şi la probele incubate numai cu pepsină (fig. 2, a şi b), prin accentuarea benzii proteice a fragmentului proporţional cu timpul de incubare.

Deosebirile calitative au putut fi sesizate numai prin acţiunea ulterioară a tripsinei. Apariţia fragmentului enzimatic încă de la 15 şi 30 min de acţiune a pepsinei se confirmă prin complexarea lui cu tripsina adăugată la 0 min (fig. 4, a) cu păstrarea activităţii enzimatice comparativ cu probele similare fără tripsină (fig. 2, a şi 3, b), unde fragmentul apare abia după o oră de pepsinoliză. Complexarea cu tripsină nu inactivează fragmentul de la 1—3 ore de pepsinoliză (pl. I, 4), dovedind încă o dată că numai tripsinoliza de 30 min reuşeşte să demonstreze proprietăţile structurale deosebite ale fragmentului de la 1—3 ore de pepsinoliză.

De reţinut comportarea absolut similară a fragmentelor de la RN-azele A şi B, ceea ce este de aşteptat avînd în vedere proporţia mare de RN-ază A în preparatul de RN-ază B.

Comportarea la pepsinoliză a RN-azelor A şi B este asemănătoare acţiunii elastazei (5), cu toate că fiecare acţionează la alt capăt al moleculei de RN-ază, C-terminal şi, respectiv, N-terminal.

Fragmentul activ enzimatic obţinut prin acţiunea elastazei (RN-ază E) este foarte sensibil la acţiunea ulterioară a tripsinei, comportare asemănătoare cu a fragmentului obţinut de noi numai după o oră de acţiune a pepsinei.

În ceea ce priveşte RN-aza A rămasă nehidrolizată, evidenţiată de noi pe gelurile de la electroforeză, ea nu este asemănătoare cu RN-aza I rămasă nehidrolizată de elastază (5). Aceasta este hidrolizată ulterior de tripsină pînă la 56% din activitate, pe cînd RN-aza A rămasă după pepsinoliză nu este hidrolizată ulterior de tripsină, fapt evidenţiat în mod pregnant în figura 1, A.

Comportarea la tripsinoliză s-a urmărit şi la RN-aza A des-(121—124) ca un indicator al eventualelor schimbări conformaţionale suferite în urma pepsinolizei foarte limitate (8). După o oră de expunere la acţiunea tripsinei, hidroliza a fost doar de 10% faţă de 1% pentru RN-aza nativă, ea reprezentînd hidroliza a numai 1—2 legături peptidice/moleculă. Majoritatea legăturilor sensibile la tripsină rămîn inaccesibile.

Pepsinoliza, în condiţiile noastre, scindează nu numai legătura 120—121 (7), (10), ci şi alte legături, probabil de capătul N-terminal (22).

Prin pepsinoliză, fie la capătul C-terminal, fie la capătul N-terminal, nu se obţine un tip de RN-ază care să devină susceptibilă ulterior tripsinolizei, ca în cazul acţiunii elastazei (5).

La aceeaşi concluzie ne conduce şi faptul că reducerea puternică a benzii proteice la RN-aza A tratată cu tripsină 30 min după pepsinoliză 1—3 ore (fig. 5, a şi b) este total diferită de menţinerea aproape constantă a aceleiaşi benzi la acţiunea numai a pepsinei (fig. 2, a şi b) sau la acţiunea pepsinei cu adăugare de tripsină 0 min (fig. 4, a şi b). Această diferenţă nu se reflectă în curbele de activitate, toate trei experimentele dînd curbe care se suprapun. Tripsina scindează totuşi molecula RN-azei restante modificată de către pepsină 1—3 ore, dar în regiuni care nu afectează centrul activ.

În prima etapă a pepsinolizei, Ginsburg şi Schachman (22) remarcă o creştere a viscozităţii soluţiei, pe care o atribuie configuraţiei moleculelor RN-azei parţial digerată, devenită mai anisomerică decît cea nativă.

În aceeaşi perioadă mai constatăm, pe lîngă o etalare mai largă a moleculei proteice pe gel, o creştere a activităţii RN-azei sub acţiunea de

30 min a tripsinei. Creşterea activităţii, sesizată spectrofotometric, nu se evidenţiază şi pe gel. Ea este specifică RN-azei A, fiind mult mai puţin evidentă în cazul RN-azei B, cu toată prezenţa în cantitate mare a RN-azei A în acest preparat (fig. 1, B).

Toate aceste date denotă o modificare a structurii RN-azei, specifică primei etape a pepsinolizei, care conduce la posibilitatea refacerii activităţii sub influenţa tripsinei. Are loc un fenomen analog cu refacerea RN-azei A din RN-aza S şi peptidul S (23).

Din figura 1 reiese foarte limpede diferenţa de comportare la pepsinoliză între RN-aza A şi RN-aza B. Partea glucidică conferă moleculei o rezistenţă mult mai mare la pepsinoliză în primele 15 min, RN-aza B prezentînd o perioadă de lag în acest interval. Rezistenţa foarte mare la acţiunea pepsinei după 30 min de acţiune indică de asemenea pregnant rolul major al lanţului glucidic. S-ar putea ca această rezistenţă să aibă loc printr-un proces de dimerizare (24) între RN-azele A şi B, dovedită fiind rezistenţa ribonucleazei dimer la acţiunea subtilizinei (25). Dar experimentul cu tripsină adăugată 0 min, la care activitatea scade linear cu 8%, indică o reacţie nespecifică între componentele din mediu şi tripsină.

Tocmai probele foarte rezistente la pepsinoliza de la 1—3 ore devin paradoxal foarte sensibile la acţiunea prelungită a tripsinei, activitatea lor scăzînd cu 18%. Această scădere nu poate fi atribuită scindării fragmentului activ deoarece un fenomen analog are loc şi la RN-aza A, care este mult mai degradată de către pepsină. Colorarea gelurilor migrate dovedeşte micşorarea accentuată a intensităţii RN-azei B pînă la dispariţie, concomitent cu scăderea lină a activităţii.

Fenomenul este asemănător scindării cu tripsină a RN-azei I de la acţiunea elastazei (5), demonstrînd modificarea anterioară prin pepsinoliză a configuraţiei moleculei RN-azei B, care devine mai rezistentă la această degradare, dar mai susceptibilă la degradarea ulterioară prin tripsinoliză.

Toate rezultatele noastre demonstrează că prezenţa lanţului glucidic la asparagina 34 modifică structura terţiară a RN-azei B în aşa fel încît ea se comportă diferit de RN-aza A atît la pepsinoliză cît şi la tripsinoliza ulterioară, dovedind implicarea părţii glucidice în procesul de degradare.

CONCLUZII

— Pepsinoliza RN-azelor A şi B, realizată în condiţiile menţionate, conduce începînd de la o oră de acţiune la apariţia unui fragment activ enzimatic pe lîngă RN-azele rămase nemodificate.

— Prin acţiunea ulterioară a tripsinei se evidenţiază însă două tipuri de fragmente enzimatice, cel de la 15—30 min şi cel de la 1—3 ore de pepsinoliză, primul rezistent şi al doilea susceptibil la acţiunea tripsinei.

— Modificările structurale net deosebite ale RN-azelor în timpul pepsinolizei, faţă de cele din timpul tripsinolizei, sesizate prin disc-electroforeză în PAA, nu se reflectă în curbele de activitate.

— În prima etapă de hidroliză are loc o modificare în structura RN-azei A cu scăderea activităţii, care permite refacerea activităţii prin incubare cu tripsină.

— Partea glucidică conferă moleculei de RN-ază B o rezistenţă mult mai mare la pepsinoliză manifestată printr-o perioadă iniţială de lag şi mai evidentă la 1—3 ore de acţiune.

— Pepsinoliza modifică totuşi structura RN-azei B, nereflectată la nivelul activităţii, făcînd-o mult mai susceptibilă la acţiunea ulterioară a tripsinei.

— Prezenţa lanţului glucidic modifică structura terţiară a RN-azei B, conferindu-i altă comportare la proteoliză, dovedind implicarea părţii glucidice în procesul de degradare.

Prezentat la redacţie
la 9 iunie 1984

* *Department of Biochemistry, Faculty of Agriculture, El Mansoura University, Egypt*
** *Institutul de ştiinţe biologice, Laboratorul de imunochimie, Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296*

IS THERE ANY DIFFERENCE BETWEEN THE PATTERN OF PROTEOLYTIC BREAKDOWN OF RN-ases WITH (RN-ase B) AND WITHOUT (RN-ase A) A SUGAR MOIETY?

SUMMARY

Pancreatic RN-ases A and B were subjected to pepsin digestion for various periods of time followed by trypsinolysis. The remaining RN-ase activity after the proteolytic attack was determined quantitatively by the spectrophotometric method and qualitatively by polyacrylamide gel electrophoresis. Incubation with pepsin alone inactivates RN-ase A faster than RN-ase B. The proteolysis of RN-ase A and B shows marked differences when incubation with pepsin does not exceed 30 min. Similar results were recorded if after 30 min. the pepsin-treated RN-ases were subjected to tryptic digestion. Thus, during the first 30 min. of pepsin action RN-ase A undergoes conformational changes so that the possible tryptic digestion leads to a partial restoration of the enzyme activity. In contrast, the pepsin digestion of RN-ase B for 30 min. followed by trypsinolysis does not alter significantly the enzyme activity .However, RN-ase B is much easier hydrolyzed by trypsin if prior incubation with pepsin exceeds 1 hour. The results presented in this paper strongly suggest that the differences recorded in the pattern of RN-ase A and B breakdown by pepsin and trypsin digestion are due to the presence of a sugar moiety in the molecule of RN-ase B.

BIBLIOGRAFIE

1. C. H. W. HIRS, J. biol. Chem., **219**, 611 (1956).
2. D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN, S. MOORE, J. biol. Chem., **235**, 648 (196[illegible]
3. F. M. RICHARDS, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **44**, 162 (1958).

4. M. S. DOSCHER, C. H. W. HIRS, Biochemistry, **6**, 304 (1967).
5. W. A. KLEE, J. biol. Chem., **240**, 2900 (1965).
6. W. A. KLEE, R. A. STREATY, J. biol. Chem., **245**, 1227 (1970).
7. C. B. ANFINSEN, J. biol. Chem. **221**, 405 (1956).
8. M. C. LIN, W. H. STEIN, S. MOORE, J. biol. Chem., **243**, 6167 (1968).
9. M. C. LIN, J. biol. Chem., **245**, 6726 (1970).
10. D. PUETT, Biochemistry, **11**, 1980 (1972).
11. D. PUETT, Biochemistry, **11**, 4304 (1972).
12. C. H. W. HIRS, T. H. PLUMMER Jr., J. biol. Chem., **238**, 1396 (1963).
13. T. H. PLUMMER Jr., C. H. W. HIRS, J. biol. Chem., **239**, 2530(1964).
14. T. H. PLUMMER, Jr., J. biol. Chem., **243**, 5961 (1968).
15. T. H. PLUMMER, A. TARENTINO, F. MALEY, J. biol. Chem., **243**, 5158 (1968).
16. T. SUKENO, A. L. TARENTINO, T. H. PLUMMER, F. MALEY, Biochem. Biophys. Res. Commun., **45**, 219 (1971).
17. J. W. BAYNES, F. WALD, J. biol. Chem., **251**, 6016 (1976).
18. A. L. TARENTINO, T. H. PLUMMER, F. MALEY, J. biol. Chem., **249**, 818 (1974).
19. J. BARTHOLEYNS, C. PEETERS-JARIO, H. REYCHLER, P. BAUDHUIN, Eur. J. Biochem., **57**, 205 (1975).
20. H. C. McALLISTER Jr., Y. C. WAN, J. L. IRVIN, Anal. Biochem., **5**, 321 (1963).
21. S. VASU, S. RĂDULESCU, Microbiologia, **1**, 282 (1970).
22. A. GINSBURG, H. K. SCHACHMAN, J. biol. Chem., **235**, 115 (1960).
23. M. C. LIN, B. GUTTE, S. MOORE, R. B. MERRIFIELD, J. biol. Chem., **245**, 5159 (1970).
24. A. M. CRESTFIELD, W. H. STEIN, S. MOORE, Arch. Biochem. Biophys., Suppl. **1**, 217 (1962).
25. M. LIBONATI, T. TANIGUCHI, E. LEONE, Biochim. biophys. Acta, **317**, 160 (1973).

LECTINE – NOI PERSPECTIVE ÎN BIOLOGIA CELULARĂ ȘI ÎN BIOCHIMIA CLINICĂ

JUNONA COLCEAG

I. LECTINE

1. Introducere
2. Proprietăți
   2.1. Specificitate de glucid
   2.2. Specificitate de grup sanguin
   2.3. Mitogenicitate
3. Distribuție și implicații biologice

II. APLICAȚII ALE LECTINELOR

1. Fracționarea oligozaharidelor, glicopeptidelor, glicoproteinelor
2. Studiul receptorilor de membrană
3. Separarea de celule
4. Studiul formelor microheterogene ale glicoproteinelor. Aplicații în diagnosticul clinic
5. Utilizări în terapie
6. Selecția de mutante rezistente la lectine

I. LECTINE

1. Introducere

Termenul „lectină", introdus în 1954 de către Boyd (1), este utilizat astăzi pentru a desemna „o proteină de origine neimună, care se leagă de glucide și care aglutinează celule și/sau precipită glicoconjugați" (2).

Interesul pentru lectine a crescut foarte mult în ultimii 15 ani datorită posibilităților pe care le ofereau în studiul membranelor celulare.

În istoria lectinelor, cinci momente pot fi considerate de importanță deosebită (3). În 1888, Stillmark descoperă că ricina, o proteină toxică extrasă din *Ricinus communis*, posedă capacitatea de a aglutina eritrocitele. În 1926, Summer și Howell descriu proprietatea concanavalinei A, extrasă din semințele de *Canavalia ensiformis* de a precipita glicogenul și amidonul din soluții. Pe baza acestei observații, autorii au sugerat că reacția de hemaglutinare prin Con A este datorată reacției dintre lectină și glucidele prezente pe suprafața eritrocitului. În 1945, Boyd observă că aglutinina din *Phaseolus lunatus* aglutinează eritrocitele umane de grup A, dar nu pe cele de grup B și 0. Pe baza acestor rezultate, Boyd propune în 1954 pentru aglutinine termenul de „lectină", de la cuvîntul latin „legere" (a alege). În 1960, Howell arată că fitoaglutinina (PHA) este mitogenă și stimulează transformarea limfocitelor în limfoblești. În 1963, Aub și colaboratorii demonstrează că aglutinina din germeni de grîu aglutinează celulele maligne la concentrații mult mai scăzute decît

cele cerute pentru aglutinarea celulelor normale. Prin această observaţie se demonstra că structura glicoconjugaţilor aparţinînd membranelor celulelor maligne este profund alterată şi se avansa ideea că aceste modificări moleculare ar putea fi corelate cu apariţia neoantigenelor de suprafaţă şi ar putea constitui un factor al inducţiei cancerului, al difuziei metastazice şi al răspunsului imun.

Datorită acestor observaţii, atenţia comunităţii ştiinţifice a fost focalizată asupra grupărilor glucidice ale glicoconjugaţilor, ceea ce a condus la utilizarea lectinelor în studiul modificărilor glicoconjugaţilor în timpul creşterii, diferenţierii şi transformării maligne.

2. Proprietăţi

Lectinele sînt proteine sau glicoproteine constituite dintr-un număr variabil de subunităţi. Majoritatea conţin subunităţi identice sau aproape identice din punctul de vedere al greutăţii moleculare. Există însă şi excepţii de la această arhitectură, toate aparţinînd tribului *Viciae*. Aceste lectine conţin două tipuri de subunităţi, de mărime diferită, care formează tetrameri de tipul $\alpha_2\beta_2$ (4), (5).

Lectinele prezintă cel puţin două situsuri de legare pentru glucid, ceea ce explică de ce ele precipită polizaharide, glicoproteine şi glicopeptide şi de ce aglutinează celule. Legarea lectinei de glucid poate implica forţe diferite, în special forţe hidrofobe şi legături de hidrogen şi doar rareori forţe electrostatice, deoarece majoritatea monoglucidelor cu care interacţionează lectinele nu sînt încărcate electric (6).

În tabela 1 sînt prezentate cîteva proprietăţi ale unor lectine comune.

Tabela 1

Proprietăţi ale unor lectine comune

Lectina	Natura glicoproteică	Greutatea moleculară	Subunităţi	Situsuri de legare glucid	Specificitatea de glucid
Concanavalina A (Con A)	—	102 000	4	4	α-Man,α-Glc
Aglutinina din germeni de grîu (WGA)	—	36 000	2	4	GlcNAc
Aglutinina din alune (PNA)	—	110 000	4	2	-Gal
Aglutinina din soia (SBA)	+	120 000	4	2	GalNAc
Aglutinina din ricin (RCA_I)	+	120 000	4	2	-Gal
Limulina	+	340 000	12	—	NeuNAc

2.1. *Specificitate de glucid*

Specificitatea de glucid a lectinelor este stabilită prin metoda inhibiţiei, prin care diferite glucide sînt testate pentru capacitatea de a inhiba hemaglutinarea sau precipitarea glicoconjugaţilor realizate de lectine.

Specificitatea lectinei este definită în termenii celui mai bun glucid inhibitor. Printre cele mai frecvente glucide care prezintă afinitate semnificativă pentru diferite lectine se numără D-galactoza, D-manoza, D-glucoza, N-acetilgalactozamina, N-acetilglucozamina și L-fucoza (7). Acidul sialic, care este cel mai răspîndit glucid terminal al glicoproteinelor de pe suprafața celulelor animale, prezintă cea mai mică afinitate pentru oricare dintre fitolectinele cunoscute, cu excepția WGA (8).

În funcție de glucidul specific, lectinele au fost clasificate în mai multe grupe (tabela 2).

Tabela 2

Specificitatea de glucid a unor lectine

Glucidul specific	Lectina	Specia
α-Man,α-Glc	Con A	*Canavalia ensiformis*
	LCA	*Lens culinaris*
	VFA	*Vicia faba*
	PSA	*Pisum sativum*
-Gal	RCA	*Ricinus communis*
	PNA	*Arachis hypogeae*
GalNAc	SBA	*Glycine max*
	HP	*Helix pomatia*
GlcNAc	WGA	*Triticum vulgaris*
	UEA_{II}	*Ulex europaeus*
α-L-Fuc	LTA	*Lotus tetragonolibus*
	UEA_{I}	*Ulex europaeus*
NeuNAc	limulină	*Limulus polyphemus*

Trebuie menționat faptul că există unele lectine pentru care nu au fost găsite monoglucide specifice, cum este cazul lectinelor extrase din *Agaricus bisporus* (9), *A. campestris* (10), *A. edulis* (11) și *Vicia graminea* (12), care necesită structuri glucidice mai complexe pentru o interacțiune eficientă.

O perioadă lungă de timp s-a crezut că lectinele se leagă de monozaharidele terminale. Numeroase studii recente au demonstrat însă că lectinele sînt capabile să recunoască și să se lege de structuri oligozaharidice interne (13), (14), (15), (16). Astfel, lectine considerate identice din punctul de vedere al specificității de monoglucid diferă prin abilitatea de a recunoaște diferențe fine în structurile oligozaharidice mai complexe. Un exemplu îl constituie Con A și LCA, lectine specifice pentru α-D-manoză. Pentru aceste lectine, structurile cele mai puternic inhibitoare sînt structurile oligozaharidice prezentate în tabela 3. Se observă că prezența fucozei mărește afinitatea LCA pentru structura oligozaharidică respectivă. Studiile lui Kornfeld și colab. (17) au demonstrat că fucoza constituie un determinant important și pentru aglutinina din mazăre (PSA), care face parte din aceeași grupă cu Con A și LCA (tabela 2).

De asemenea, o anumită lectină este capabilă să recunoască secvențe glucidice foarte diferite. De exemplu, Con A se leagă de structuri α-oligomanozidice, dar se leagă și de structuri N-acetillactozaminice.

Tabela 3

Structura oligozaharidelor cu cel mai puternic efect inhibitor al hemaglutinării dat de Con A şi de LCA (16)

Lectina	Monoglucidul specific	Oligozaharidul specific
Con A	α-Man	GlcNAcβ1-2Manα2—3 Manβ1—4GlcNAc(β1—4GlcNAc)
LCA	α-Man	GlcNAcβ1—2Manα1—6 GlcNAcβ1—2Manα1—3 Manβ1—4GlcNAcβ1—4GlcNAcα1—6 GlcNAcβ1—2Manα1—6 Fuc

Toate aceste date demonstrează complexitatea fenomenului de recunoaştere dintre lectină şi structura oligozaharidică şi impun cercetătorilor o deosebită grijă în interpretarea rezultatelor obţinute în studiul glicoconjugaţilor cu ajutorul lectinelor.

2.2. *Specificitate de grup sanguin*

Iniţial s-a crezut că aglutinarea selectivă a eritrocitelor umane (de grup 0, A, B) reprezintă o proprietate generală a lectinelor (1). Studiile ulterioare au demonstrat însă că numai unele lectine prezintă specificitate de grup sanguin.

În tabela 4 sînt date cîteva exemple de lectine utilizate în determinarea clinică a grupelor sanguine.

Tabela 4

Aglutinarea selectivă a eritrocitelor de către lectine (3)

Grupe sanguine	Lectine	Inhibitori
A	*Dolichos bifforus*	GalNAc
	Phaseolus limensis	GalNAc
	Helix pomatia	GalNAc
B	*Bandeirea simplicifolia*	Gal
0	*Lotus tetragonolobus*	L-Fuc
	Anguilla anguilla	L-Fuc
N	*Vicia graminea*	antigen N

Redăm în continuare distribuţia fitolectinelor cu specificitate de grup sanguin pe familii reprezentative de plante (18), (19).

Anti-A

Familia Leguminosae

Amphicarpea bracteata
Astragalus onobrychis
Bauhinia purpurea
Crotalaria aegyptica
C. breviflora
C. mucronata

Lathyrus sylvestris
Phaseolus caracalla
Ph. limensis
Vicia cracca
V. dumentorum
V. hirsuta
V. peregrina
V. villosa
Caragana brevispina
C. decorticans
Pueraria lobata

Familia **Malvaceae**
Hibiscus esculentus
Urena lobata

Anti-A_1

Familia **Leguminosae**
Dolichos bifforus

Anti-A_2

Familia **Leguminosae**
Ulex europaeus

Anti-B

Familia **Leguminosae**
Alysicarpus vaginalis
Bandeireae simplicifolia
Crotalaria intermedia
Phaseolus ricciardiarus
Familia **Celastraceae**
Evonymus alatus
E. bungaena
E. japonica
E. latifolia
E. mackii
E. planipes
E. sachalinensis
E. sacrosancta
E. sieboldiana
E. verrucosa

Anti-H (0)

Familia **Leguminosae**
Bauhinia monondra
Brownea hybrida
Cytisus sessilifolius
Laburnum alpinum

Anti-N

Familia **Leguminoase**
Bauhinia bonantiana
B. candidans
B. purpurea
B. variegata
Vicia graminea
V. leganyana

Anti-M

Familia **Cruciferae**
Iberis amara
I. sempervirens
I. umbellata

Anti-T

Familia **Leguminosae**
Arachis hypogeae
Termophis caroliniana

Anti-Rh

Familia **Verbenaceae**
Clerodendron trichotomum

2.3. *Mitogenicitate*

Din anul 1960, lectine ca PHA și Con A au captat atenția imunologilor datorită, în primul rînd, proprietăților lor mitogene. Aceste lectine induc blastogeneza și stimulează proliferarea limfocitelor. Spre deosebire de majoritatea antigenelor, lectinele sînt substanțe mitogene policlonale; totuși, ele sînt utile în studierea mecanismului prin care un antigen declan-

șează proliferarea unei anumite clase de limfocite. Atît PHA, cît și Con A stimulează celulele T, dar nu și celulele B, astfel încît pot fi utilizate pentru identificarea subpopulațiilor majore de limfocite.

Unele lectine (PHA și SBA) sînt mitogene, dar sub formă polimerizată și nu stimulează limfocitele umane sau de șoarece, dacă aceste celule nu au fost tratate anterior cu sialidază (20).

3. Distribuție și implicații biologice

Lectinele sînt larg răspîndite în regnul vegetal. Pînă în prezent au manifestat activitate hemaglutinantă 800 de specii aparținînd la 85 de familii din 192 investigate (19). Din familia *Fabaceae*, cu un total de 1050 de specii, 451 de specii conțin aglutinine. Dintre neleguminoase pot fi menționate familiile *Euphorbiaceae*, *Rosaceae*, *Solanaceae*, *Celastraceae*, *Malvaceae* și *Verbenaceae* (19).

Lectinele se găsesc în plante mai ales la nivelul semințelor, fiind concentrate în cotiledoane și în țesutul embrionar. Ele prezintă 2—10% din proteinele totale ale semințelor. Acest procent scade treptat în timpul germinației semințelor, ceea ce ar putea sugera implicarea directă a lectinelor în stocarea rezervelor de hrană. Totuși, lectinele nu sînt localizate numai la nivelul semințelor, ci și la diferite nivele ale plantei verzi (rădăcină, stem, tuberculi, fruct) (21), (22), (23), (24), (25).

Pînă în prezent, deși au fost formulate mai multe ipoteze, rolul fiziologic al lectinelor în plante a rămas o necunoscută. Ultimii ani au dus la descoperirea lectinelor și în regnul animal, la nivelul membranelor celulare (26), (27), (28), (29), (30), (31), (32), (33). Au fost izolați receptori tip lectină la nivelul membranei hepatocitului. Lectinele hepatocitelor de mamifere sînt specifice pentru galactoză (34), care constituie adesea glucidul subterminal al glicoproteinelor serice. Glicoproteinele îmbătrînite, care au pierdut acidul sialic terminal, sînt recunoscute de aceste lectine și astfel îndepărtate din circulație (35).

Receptori tip lectină cu specificitate pentru galactoză au fost identificați și la nivelul membranei celulelor reticuloendoteliale, cum ar fi celulele Kupffer și alte celule sinusoidale.

Spre deosebire de receptorii hepatocitelor, care mediază endocitoza moleculelor și a particulelor mici, receptorii celulelor Kupffer sînt responsabili de îndepărtarea din circulație a particulelor multivalente, cum ar fi complexele antigen/anticorp (36), (37). Ambele tipuri de receptori sînt implicate în recunoașterea limfocitelor și a eritrocitelor desializate (38), (39), (40), (41) sau a celulelor tumorale (42).

Studii recente au dus la identificarea și la izolarea unor lectine specifice pentru lactoză din diferite țesuturi ale puiului de găină (ficat, mușchi, intestin) (43), (44), (45).

Mai menționez identificarea receptorilor specifici pentru fosfomanoză, care sînt implicați în recunoașterea diferitelor hidrolaze lizozomale. Acești receptori au fost evidențiați la nivelul hepatocitelor de șobolan și bou, al celulelor ovariene de hamster și al fibroblaștilor umani (46), (47).

Au fost de asemenea identificate și izolate lectine de la nevertebrate (48), (49) și de la microorganisme, cum ar fi *Escherichia coli* (50), *Pseudomonas aeruginosa* (51), (52), mixobacterii (53), diferite specii de *Strepto-*

myces (54) etc. Astfel de lectine par a fi implicate în procese biologice complexe, cum ar fi interacţiunea gazdă—microorganism (55), (56), fenomenul de adeziune celulară (57) sau fenomenele de recunoaştere sexuală (58).

II. APLICAŢII ALE LECTINELOR

1. Fracţionarea oligozaharidelor, glicopeptidelor, glicoproteinelor

Lectinele imobilizate pe diferite suporturi sînt larg utilizate pentru fracţionarea glicoproteinelor membranare sau solubile, ca şi a glicopeptidelor obţinute din glicoproteine membranare sau solubile (59). S-a obţinut astfel purificarea unei varietăţi de glicoconjugaţi, incluzînd enzime (60), (61), hormoni (62), interferon (63), proteine serice (64), (65), numeroase antigene (66), (67), (68), (69), (70), (71) şi subunităţi antigenice provenite de la diferite virusuri (72).

Pentru fracţionarea glicopeptidelor se utilizează cromatografia de afinitate secvenţială pe diferite tipuri de lectine imobilizate. Prin această tehnică au fost izolate glicopeptide aparţinînd membranei hepatocitului de şobolan (73), glicopeptide provenite de la IgA secretoare umană (Pierce-Cretel şi colab. citaţi de (3), p. 252) şi glicopeptide aparţinînd fibroblaştilor normali şi transformaţi (74). În ultimul caz, datele obţinute au demonstrat că diferenţele dintre celulele normale şi cele transformate sînt mai mult de ordin cantitativ decît calitativ.

În ultimii ani, o serie de studii au relevat potenţialul pe care îl au coloanele cu lectine imobilizate pentru recunoaşterea unor diferenţe subtile în structurile oligozaharidice. De exemplu, pe o coloană de Con A-Sepharose se pot prinde doar structuri oligozaharidice care au cel puţin două resturi de α-D-manopiranozil cu grupări hidroxil libere la C-3, C-4 şi C-6. Există o literatură bogată privind proprietăţile de recunoaştere a diferitelor structuri oligozaharidice de către diverse lectine imobilizate pe coloane (75). Folosind aceste date, este posibil să se dezvolte sisteme de cromatografie de afinitate pentru rezoluţia unei mari varietăţi de substanţe ce conţin secvenţe oligozaharidice.

2. Studiul receptorilor de membrană

Glicoproteinele şi glicolipidele membranare joacă un rol important într-o serie de procese biologice esenţiale care implică interacţiuni între macromolecule sau între celule. La baza acestor tipuri de reacţii stă funcţia de recunoaştere (de receptor), care este facilitată de marea heterogenitate a componentei glucidice a glicoconjugaţilor. În cursul diferenţierii celulare sau în diferite stări patologice ale celulei, componenta glucidică suferă o serie de modificări structurale, mai mult sau mai puţin complexe, care conduc implicit la modificarea funcţiei de recunoaştere. De aceea, glicoproteinele şi glicolipidele membranare pot caracteriza foarte bine starea de diferenţiere a celulelor şi a ţesuturilor sau gradul lor de malignitate.

Există două modalități de a urmări modificările subtile ale structurii glicoconjugaților : măsurarea aglutinării celulelor cu lectine nemarcate și vizualizarea situsurilor de legare a lectinei folosind lectine marcate. În microscopia electronică se utilizează conjugați lectină-fluorocromi (76) sau conjugați lectină-enzimă (77). În acest caz, lectinele sînt legate de particule electrondense, cum ar fi feritina (78) sau aurul coloidal (79), sau de enzime, cum ar fi peroxidaza (80). Studiile de acest gen au relevat asimetria membranelor celulare, compartimentarea strictă a structurilor glucidice în cadrul endomembranelor celulare (81) și au evidențiat modificările care apar la nivelul receptorilor de membrană în cursul carcinogenezei și al diferențierii celulare. Dintre lectinele care s-au dovedit deosebit de utile în studiile de carcinogeneză și de diferențiere celulară, amintesc PNA (aglutinina din *Arachis hypogeae*), care este folosită ca marker pentru limfocitele nediferențiate și pentru celulele diferențiate ale glandei mamare (82), (83), (84), (85), (86), și WGA (aglutinina din germeni de grîu), folosită ca marker pentru celulele tumorale (87).

Marcarea lectinelor cu izotopi radioactivi a făcut posibile studiile cantitative de legare a lectinelor (88). Astfel au fost determinate cantitativ situsurile de legare a lectinelor (89), (90) și au fost demonstrate fenomene de cooperare (91) și de internalizare a receptorilor (92).

3. Separarea de celule

Lectinele s-au dovedit a fi un instrument util în separarea celulelor normale, a celulelor transformate și a organitelor care prezintă diferite structuri glucidice de membrană (93), (94). În principiu, orice populație de celule eucariote sau procariote poate fi separată în subpopulații, dacă există diferențe ale structurilor glucidice de suprafață. În acest scop pot fi folosite două modalități : aglutinarea diferențială cu lectine solubile și cromatografia de afinitate pe lectine insolubilizate (6), (95), (96), (97). Primul caz poate fi ilustrat de metoda de fracționare a subpopulațiilor de celule T umane și de șoarece, în medulară (matur) și corticală (imatur), propusă de Sharon (97) pe baza observației că receptorii celulari de suprafață pentru PHA și SBA se modifică în timpul diferențierii și maturării limfocitelor.

În al doilea caz, separarea celulelor este realizată prin cromatografie de afinitate, folosind lectine imobilizate pe Sepharose sau pe nylon. Celulele fixate sînt apoi eluate cu glucidele specifice pentru lectina folosită. Pereira și Kabat (98) au propus un nou tip de cromatografie de afinitate pentru separarea celulelor, în care lectinele sînt legate specific de o glicoproteină imobilizată pe Sepharose. Celulele care se prind pe o astfel de coloană sînt eluate împreună cu lectina, cu un glucid specific.

4. Studiul formelor microheterogene ale glicoproteinelor. Aplicații în diagnosticul clinic

Datorită diferențelor existente la nivelul componentei glucidice, multe glicoproteine prezintă două sau mai multe forme microheterogene. Microheterogenitatea glicoproteinelor poate fi analizată fie prin cromatografie de afinitate cu lectine imobilizate, fie prin imunoelectroforeză

de afinitate bidimensională cu lectină inclusă în gel în prima dimensiune. A doua metodă, care combină interacțiunea biospecifică dintre lectină și glicoproteină cu imunoelectroforeza bidimensională, este net superioară primei metode, atît din punctul de vedere al eficienței cît și al mărimii probei (99).

Prin această metodă au fost studiate mai multe glicoproteine în diferite stări fiziologice și patologice ale organismului. Printre acestea se numără feritina (100), glicoproteina alfa-1-acidă (101), inhibitorul alfa al tripsinei (102), factorul antihemofilic (103) și alfa-fetoproteina (AFP) (104), (105), (106), (107), (108), (109).

Cel mai intens studiată a fost AFP umană. Determinarea fracțiunilor microheterogene ale AFP din lichidul amniotic uman și din serul matern s-a dovedit a fi de mare interes în diagnosticul prenatal al defectelor tubului neural (107), (108), (109), (110). Studiindu-se microheterogenitatea AFP fetale și AFP din tumorile producătoare de AFP, au fost determinate anumite aspecte ale dezvoltării maligne (109). Astfel, aceste studii au condus la concluzia că baza celulară pentru producția de AFP în tumorile maligne este biochimic analogă cu cea pentru producția de AFP de către celulele embrionare ale ficatului în timpul embriogenezei timpurii.

Transferina serică umană constituie un alt exemplu în care studiul formelor microheterogene poate deveni util în diagnosticul clinic al unor maladii, cum ar fi hepatita virală și ciroza (111).

În ultimii ani au fost elaborate unele variante ale acestei tehnici, cum ar fi imunoelectroforeza de afinitate în trei dimensiuni (112) și radioimunoelectroforeza de afinitate bidimensională (113). Trebuie subliniat că aceste metode sînt doar semicantitative și că pentru a putea obține o determinare cantitativă precisă se utilizează imunoelectroforeza de afinitate tip Laurell (114).

5. Utilizări în terapie

Un alt domeniu în care lectinele par să fie de viitor este terapia orientată strict către țesutul țintă și în mod particular terapia tumorilor maligne (115), (116). Lectinele cuplate de enzime sau de medicamente ar putea constitui o nouă modalitate terapeutică de asigurare a unui efect focalizat și de durată la nivelul țesuturilor țintă (117). Astfel s-a reușit introducerea și reținerea galactozidazei la nivelul fibroblaștilor din cultură în boala Fabry, care se caracterizează printr-o deficiență în sinteza acestei enzime (118).

O altă problemă de viitor o constituie posibilitatea de a utiliza carbohidrați specifici pentru o anumită lectină implicată în procese biologice nocive pentru organism, în scopul blocării lectinei respective. Voi aminti aici două studii recente în această direcție.

În primul studiu este emisă ipoteza că lectinele hepatocitului ar putea juca un rol în procesul metastazic al tumorilor, acționînd ca acceptori pentru antigenul Thomsen-Friedenreich, prezent pe suprafața celulelor tumorale. În această situație, procesul ar putea fi inhibat prin blocarea lectinelor hepatocitului cu carbohidrații adecvați (119).

În al doilea studiu se demonstrează că bacterii ca *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp. și *Proteus* sp. posedă pe suprafață lectine care mediază ade-

renţa bacteriilor la uroepiteliu, conducînd la infecţia celulelor epiteliale. Se sugerează posibilitatea utilizării, în scopuri profilactice, a derivaţilor manozei pentru blocarea lectinelor bacteriene (120).

6. Selecţia de mutante rezistente la lectine

Lectine ca PHA sau Con A sînt citotoxice, dar numai la concentraţii mai mari decît cele folosite în mod normal pentru stimularea mitogenă a limfocitelor.

Alte lectine, cum ar fi ricina, abrina, modeccina şi aglutinina din germeni de grîu, sînt puternic toxice la doze scăzute. Aceste lectine au fost utilizate pentru a izola celule mutante care să fie mai rezistente la citotoxicitatea dată de lectină decît celulele parentale. Celulele sînt tratate cu lectina selectivă, iar celulele care supravieţuiesc sînt clonate. Se repetă operaţia şi se obţin celule care prezintă o rezistenţă la lectină de 10—500 de ori mai mare decît celulele parentale (121).

O primă etapă obligatorie în medierea citotoxicităţii lectinei este legarea acesteia de secvenţe glucidice specifice prezente la suprafaţa celulară. De aceea, celulele care în mod normal sînt sensibile la lectina toxică pot supravieţui în prezenţa unui glucid adecvat, care funcţionează ca haptenă. Haptena se leagă de lectină şi previne legarea acesteia de glicoconjugaţii de pe suprafaţa celulară. O modalitate importantă prin care o celulă poate deveni rezistentă la o lectină toxică este modificarea compoziţiei glucidice a glicoconjugaţilor de pe suprafaţa celulei, împiedicînd astfel legarea lectinei de aceştia. Această modificare structurală a glicoconjugaţilor poate fi indusă pe două căi : prin modificări ale nivelelor celulare ale glicoziltransferazei I (122), (123) şi prin modificări ale nivelelor celulare ale glicozidazelor.

Celulele mutante obţinute constituie un material nou, de mare potenţial în studierea rolului biologic al carbohidraţilor de membrană şi în explorarea metabolismului glicanilor. Se apreciază de asemenea că pot fi modele adecvate în studiul relaţiilor dintre suprafeţele celulare şi cancer (3).

Prezentat la redacţie
la 9 iunie 1984

*Institutul de ştiinţe biologice,
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296*

BIBLIOGRAFIE

1. W. C. BOYD, E. SLAPEIGH, Science, **119**, 419 (1954).
2. I. J. GOLDSTEIN, R. C. HUGHES, M. MONSIGNY, T. OSAWA, N. SHARON, Nature, **285**, 66 (1980).
3. J. MONTREUIL, H. DEBRAY, P. DEBEIRE, P. DELANNOY, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, W. REUTTER, F. GAUDAT, E. KOTTGEN, MTP Press Ltd., Boston, 1983, p. 239.
4. H. RUDIGER, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1981, p. 3.
5. N. SHARON, Sci. Amer., **236**, 108 (1977).
6. N. SHARON, în *Progress in Immunology IV*, vol. 1, sub red. M. FOUGEREAU, J. DAUSSET, Academic Press, New York, 1980, p. 285.
7. R. KORNFELD, S. KORNFELD, Annu. Rev. Biochem., **45**, 2117 (1976).
8. V. P. BHAVANANDAN, A. W. KATLIC, J. biol. Chem., **254**, 4000 (1979).

9. R. KAIFU, T. OSAWA, Carbohydr. Res., **69**, 79 (1979).
10. H. SAGE, J. J. VAZQUEZ, J. biol. Chem., **242**, 120 (1967).
11. R. EIFLER, P. ZISKA, Experientia, **36**, 1285 (1980).
12. M. J. PRIGNENT, P. BOURILLON, Biochim. biophys. Acta, **420**, 112 (1976).
13. R. KORNFELD, C. FERRIS, J. biol. Chem., **250**, 2614 (1975).
14. J. U. BAENZIGER, D. FIETE, J. biol. Chem., **254**, 9795 (1979).
15. H. DEBRAY, G. DECOUT, G. STRECKER, J. MONTREUIL, M. MONSIGNY, în *Protides of Biological Fluids*, vol. 27, sub red. H. PEETERS, Pergamon Press, Oxford—New York—Toronto, 1979, p. 451.
16. H. DEBRAY, D. DECOUT, G. STRECKER, G. SPIK, J. MONTREUIL, Eur. J. Biochem., **117**, 41 (1981).
17. K. KORNFELD, M. L. REITMAN, R. KORNFELD, J. biol. Chem., **256**, 6633 (1981).
18. E. R. GOLD, P. BALDING, în *Receptor — Specific Proteins*, American Elsevier Publishing Company, Inc., New York, 1975, p. 151.
19. G. L. TOMS, A. WESTERN, în *Chemotaxonomy of Leguminosae*, sub red. J. E. HARBORNE, D. BOULTER, B. L. TURNER, Academic Press, New York, 1971, p. 567.
20. H. LIS, N. SHARON, în *The Antigen*, vol. 4, sub red. M. SELA, Academic Press, New York, 1977, p. 429.
21. M. S. NACHBAR, J. D. OPPENHEIM, în *Methods in Enzymology*, vol. 83, partea D, sub red. V. GINSBURG, Academic Press, New York, 1982, p. 363.
22. A. K. ALLEN, Biochem. J., **183**, 133 (1979).
23. N. N. DESAI, A. K. ALLEN, Anal. Biochem., **93**, 88 (1979).
24. N. S. NACHBAR, J. D. OPPENHEIM, J. biol. Chem., **255**, 2056 (1980).
25. D. ASHFORD, A. K. ALLEN, A. NEUBERGER, Biochem. J., **201**, 641 (1982).
26. P. SEUDDER, R. A. CHILDS, T. FEIZI, Biochem. Biophys. Res. Commun., **104**, 272 (1982).
27. R. T. LEE, Biochemistry, **21**, 1045 (1982).
28. M. SARKAR, J. LIAO, E. KABAT, T. TANABE, G. ASHWELL, J. biol. Chem., **254**, 3170 (1979).
29. H. SCHULTE, M. MONSIGNY, Biol. Cell., **42**, 13 (1981).
30. J. U. BAENZIGER, Y. MAYNARD, J. biol. Chem., **225**, 4607 (1980).
31. R. A. CHILDS, T. FEIZI, Biochem. J., **183**, 755 (1979).
32. B. BRILES, W. GREGORY, P. FLETCHER, S. KORNFELD, J. Cell. Biol., **18**, 528 (1979).
33. J. POWELL, Biochem. J., **187**, 123 (1980).
34. G. ASHWELL, J. HARFORD, Annu. Rev. Biochem., **51**, 531 (1982).
35. G. ASHWELL, A. G. MORELL, Advanc. Enzymol., **41**, 99 (1974).
36. D. VOGT, H. KOBB, în *Lectins—Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 2, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1982, p. 36.
37. V. KOLB-BACHOFEN, J. S. CHLEPPER-SCHAFER, R. TERADEIRA, D. VOGT, H. KOBB, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Ltd., Boston, 1983, p. 277.
38. H. KOLB, C. SCHUDT, V. KOLB-BACHOFEN, H. A. KOLB, Exp. Cell. Res., **113**, 319 (1978).
39. H. KOLB, A. KRIESE, V. KOLB-BACHOFEN, H. A. KOLB, Cell. Immunol., **40**, 457 (1978).
40. H. KOLB, J. S CHLEPPER-SCHAFER, V. KOLB-BACHOFEN, Biol. Cell., **36**, 301 (1979).
41. E. A. FRIEDRICH, V. BURKART, H. KOLB, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Ltd., Boston, 1983, p. 622.
42. N. HOLL, J. SCHLEPPER-SCHAFER, V. KOLB-BACHOFEN, E. FRIEDRICH, H. KOLB, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Ltd., Boston, 1983, p. 623.
43. H. CERI, D. KOBILER, S. H. BARONDES, J. biol. Chem., **256**, 390 (1981).
44. E. C. BEYER, S. H. BARONDES, J. Cell. Biol., **92**, 23 (1982).
45. E. C. BEYER, S. E. ZWEIG, S.H. BARONDES, J. biol. Chem., **255**, 4236 (1980).
46. A. GONZALEZ-NORIEGA, H. J. GRUBB, V. TALKAD, W. S. SLY, J. Cell. Biol., **85**, 839 (1980).
47. G. GARY SAHAGIAN, J. J. DISTLER, G. W. JOURDIAN, în *Methods in Enzymology*, vol. 83, partea D, sub red. V. GINSBURG, Academic Press, New York, 1982, p. 392.

48. S. MOHAN, D. THAMBI DORAI, S. SRIMAL, B. K. BACHHAWAT, Biochem. J., **203**, 253 (1982).
49. S. BISHAYEE, D. T. DORAI, Biochim. biophys. Acta, **623**, 89 (1980).
50. Y. ESHDAT, N. SHARON, în *Methods in Enzymology*, vol. 83, partea D, sub red. V. GINSBURG, Academic Press, New York, 1982, p. 386.
51. G. G. NECHAMA, în *Methods in Enzymology*, vol. 83, partea D, sub red. V. GINSBURG, Academic Press, New York, 1982, p. 378.
52. N. GIBBOA-GABER, L. MIZRAHI, N. GARBER, Canad. J. Biochem., **55**, 975 (1977).
53. M. G. CUMSKY, D. R. ZUSMAN, J. biol. Chem., **256**, 12589 (1981).
54. Y. F. YAMAGCHI, K. OISHI, K. SUZUKI, K. IMAHORI, Biochim. biophys. Acta, **701**, 90 (1982).
55. B. NORDBRING-HERTZ, B. MATTIASON, Nature, **281**, 477 (1979).
56. B. NORDBRING-HERTZ, E. FRIMAN, P. A. JOHANSON, B. MATTIASON, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1981, p. 43.
57. S. D. ROSEN, J. KAUR, D. L. CLARK, B. T. PARDOS, W. A. FRAZIER, J. biol. Chem., **254**, 9408 (1979).
58. W. L. HOMAN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1981, p. 51.
59. R. LOTAN, G. L. NICOLSON, Biochim. biophys. Acta, **559**, 329 (1979).
60. K. A. BALASUBRAMANIAN, B. K. BACHHAWAT, Biochim. Biophys. Acta, **403**, 113 (1975).
61. E. V. CREAN, E. F. ROSSOMUNDO, Biochem. Biophys. Res. Commun., **75**, 488 (1977).
62. M. L. DUFAN, K. HAYASHI, G. SELA, A. BANKAL, K. J. CATT, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **75**, 4769 (1978).
63. M. W. DAVEY, E. SULKOVSKI, W. A. CARTER, Biochemistry, **15**, 704 (1976).
64. R. LOTAN, G. BEATTLE, W. HUBBEL, G. L. NICOLSON, Biochemistry, **16**, 1787 (1977).
65. P. VRETBLAD, R. HJORTH, Biochem. J., **167**, 759 (1977).
66. J. R. DAWSON, J. SILVER, L. B. SHEPPARD, D. B. AMOS, J. Immunol., **112**, 1190 (1974).
67. R. J. CARRICO, M. USATEGNI-GOMEZ, Cancer Res., **35**, 2928 (1976).
68. T. A. SPRINGER, D. L. MANN, A. J. DAFRANCO, J. L. STROMINGER, J. biol. Chem., **252**, 4682 (1977).
69. S. BISATI, L. MIKKELSEN, C. H. BROGREN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1981, p. 387.
70. C. H. BROGREN, S. BISATI, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry* vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York 1981, p. 375.
71. L. B. NIELSEN, S. BISATI, L. MIKKELSEN, C. H. BROGREN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 2, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1982, p. 496.
72. P. KARSNAS, T. KRISTIANSEN, J. MORENO-LOPEZ, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1981, p. 401.
73. H. DEBRAY, B. FOURNET, J. MONTREUIL, D. DORLAND, J. F. G. VLIEGENTHART, Eur. J. Biochem., **115**, 559 (1981).
74. D. L. BLITHE, C. A. BUCK, L. WARREN, Biochemistry, **19**, 3386 (1980).
75. C. E. HAYES, I. J. GOLDSTEIN, Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., **35**, 128 (1978).
76. I. VIRTANEN, J. WARTIOVAARA, Cell. molec. Biol., **23**, 73 (1978).
77. N. K. GONATAS, S. AVRAMEAS, J. Cell. Biol., **59**, 436 (1973).
78. I. VIRTANEN, A. MIETTINEN, J. WARTIOVAARA, J. Cell. Sci., **29**, 287 (1978).
79. J. ROTH, M. BINDER, J. Histochem. Cytochem., **26**, 163 (1978).
80. P. J. ROBINSON, P. L. PENFOLD, I. M. ROITT, Clin. exp. Immunol., **23**, 93 (1976).
81. M. YOKOYAMA, F. NISHIYAMA, N. KAWAI, H. HIRANO, Exp. Cell. Res., **125**, 47 (1980).
82. R. A. NEWMAN, P. J. KLEIN, G. UHLINBRUCK, P. CITOLER, D. KARDUCK, J. Cancer Res. Clin. Oncol., **93**, 181 (1979).
83. M. L. ROSE, F. MALCHIODI, Immunology, **42**, 583 (1981).
84. M. L. ROSE, M. S. C. BIRBECK, V. J. WALLIS, J. A. FORRESTERE, A. J. S. DAVIES., Nature, **284**, 364 (1980).

85. M. WATANABE, T. MURAMATSU, H. SHIRANE, K. UGAI, J. Histochem. Cytochem. **29**, 844 (1981).
86. D. R. HOWARD, P. FERGUSON, J. G. BATSAKIS, Cancer, **47**, 2872 (1981).
87. H. HANENSTEIN, G. GERMANN, H. P. WEILL, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 2, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1982, p. 211.
88. S. HAMMARTROM, Scand. J. Immunol., **2**, 53 (1973).
89. M. AUBERY, M. DODEUR, R. ROGUET, R. BOWRRILLON, Exp. Cell. Res., **113**, 303 (1978).
90. P. CUATRECASAS, Biochemistry, **12**, 1312 (1973).
91. Y. REISNER, H. LIS, N. SHARON, Exp. Cell. Res., **97**, 445 (1976).
92. G. L. NICOLSON, J. R. SMITH, R. HYMAN, J. Cell. Biol., **78**, 565 (1978).
93. D. H. BOLDT, R. D. LYONS, Cell. Immunol., **43**, 82 (1979).
94. V. L. BRACEIDE, H. P. FRIEDMAN, T. J. BRACIDE, J. Immun. Methods, **43**, 241 (1981).
95. H. LIS, N. SHARON, în *The Biochemistry of Plants*, vol. 6, sub red. A. MARCUS, Academic Press, New York, 1981, p. 371.
96. Y. REISNER, N. SHARON, Trends Biochem. Sci., **3**, 29 (1980).
97. N. SHARON, în *Advances in Immunology*, vol. 34, sub red. F. J. DIXON, H. G. KUNKEL, Academic Press, New York, 1982.
98. M. E. A. PEREIRA, E. KABAT, J. Cell. Biol., **82**, 185 (1979).
99. T. C. BØG-HANSEN, Anal. Biochem., **56**, 480 (1973).
100. M. M. ANDERSEN, A. LIHME, T. C. BØG-HANSEN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 2, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1982, p. 475.
101. C. WELLS, T. C. BØG-HANSEN, E. H. COOPER, M. R. GLASS, Clin. chim. Acta, **109**, 59 (1981).
102. L. FAYE, J. P. SALIER, Electrophoresis, **1**, 67 (1980).
103. J. S. KRAUS, M. H. SHEARD, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 2, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1982, p. 423.
104. J. P. KERCKAERT, B. BAYARD, G. BISERTE, Biochim. biophys. Acta, **576**, 99 (1979).
105. A MacKIEWICZ, J. BREBOROWICZ, Oncodevelop. Biol. Med., **1**, 251 (1980).
106. B. NØRGAARD-PEDERSEN, K. TOFTAGER-LARSEN, J. PHILIP, P. HINDERSSON, Clin. Genet., **17**, 355 (1980).
107. K. TOFTAGER-LARSEN, B. NØRGAARD-PEDERSEN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1981, p. 293.
108. K. TOFTAGER-LARSEN, E. KIAERSGAARD, J. C. JACOBSON, B. NØRGAARD-PEDERSEN, Clin. Chem., **26**, 1656 (1980).
109. K. TOFTAGER-LARSEN, P. L. PETERSEN, B. NØRGAARD-PEDERSEN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1981, p. 283.
110. C. J. SMITH, P. C. KELLEHER, L. BELANGER, L. DALLAIRE, Brit. med. J., **1**, 920 (1979).
111. G. SPIK, V. DEBRUYNE, J. MONTREUIL, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Ltd., Boston, 1983, p. 497.
112. A. MacKIEWICZ, J. BREBOROWICZ, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 1, sub red. T.C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1981, p. 315.
113. M. M. ANDERSEN, A. LIHME, T. C. BØG-HANSEN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 2, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1982, p. 475.
114. J. HAN, J. G. WESTERGAARD, L. IPSEN, B. TEISNER, T. C. BØG-HANSEN, K. SØNDERGAARD, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 2, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1982, p. 457.
115. S. OLSMS, K. REFSNES, A. PIHL, Nature, **249**, 627 (1974).
116. H. E. BLYTHMAN, Nature, **290**, 145 (1981).
117. S. A. BARKER, A. G. GUBLIN, C. J. GRAY, W. H. BROWN, Carbohydr. Res., **35**, 23 (1981).

118. L. HASHOLDT, S. A. SØRENSEN, în *Lectins — Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, vol. 2, sub red. T. C. BØG-HANSEN, Walter de Gruyter, Berlin—New York, 1982, p. 305.
119. J. BEUTH, P. J. KLEIN, G. UHLENBRUCK G. WINTZER, V. WEIDTMAN, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Ltd., Boston, 1983, p. 477.
120. E. RUBINSTEIN, B. TAVDIOGLU, R. SCHWARTZKOPE, A. KASKI, Israel J. med. Sci., **18**, 469 (1982).
121. R. C. HUGHES, G. MILLS, D. STOJANOVIC, în *Structural Carbohydrates in the Liver*, sub red. H. POPPER, MTP Press Ltd., Boston, 1983, p. 63.
122. A. MEAGER, A. UNGKITCHANUKIT, R. NAIRN, R. C. HUGHES, Nature, **257**, 137 (1975).
123. A. MEAGER, A. UNGKITCHANUKIT, R. C. HUGHES, Biochem. J., **154**, 113 (1976).

I. N. GIGLI, P. A. MIESCHER, H. I. MÜLLER-EBERHARDT (sub red.), *Immunodermatology* (Imunodermatologie), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1983, 183 p., 34 fig., 37 tabele

Volumul, reunind numerele 1 și 3 ale revistei internaționale „Springer Seminars in Immunopathology", cuprinde o serie de articole care tratează probleme actuale clinice, investigative și experimentale din domeniul imunopatologiei cutanate.

Se discută variate posibilități de producere a unor leziuni epidermice prin mecanisme de tip umoral sau celular. Astfel, în articolul privind etiopatogenia pemfigusului, este sugerată posibilitatea activării unor proteinaze locale de către autoanticorpii fixați, in vivo, pe membrana celulelor epidermice, ceea ce duce la degradarea substanței intercelulare, la pierderea adeziunii și la acantoliză.

Rolul complexelor imune și al complementului activat este de asemenea discutat în cazul unor boli ca dermatita herpetiformă, eritemul polimorf, boala serului, în unele forme de vascularită necrotică, afecțiuni ale țesutului conjunctiv, reacții fototoxice etc.

Volumul cuprinde o serie de articole privind biologia mastocitelor și rolul acestor celule în diferite afecțiuni, cum sînt urticaria, angioedemul și unele boli buloase.

În lumina noilor date acumulate sînt considerate mecanismele imunologice heterogene din dermatita atopică, cu variațiile lor individuale și posibilitatea intervenției unui proces autocitotoxic la nivelul fibroblaștilor dermici ce nu mai sînt sub control imunosupresor.

În capitolul privind inducerea hipersensibilizării de contact se discută rolul a două tipuri de celule, macrofagele și celulele Langerhans, în prelucrarea și prezentarea antigenului sistemului imunocompetent. Alterarea acestui mecanism poate determina efecte inverse — activarea celulelor T imunosupresoare în locul celulelor T-helper. În acest sens acționează glucocorticoizii și mai ales radiațiile ultraviolete, care reduc activitatea celulelor Langerhans din piele, împiedicînd astfel inducerea hipersensibilizării de contact.

Un amplu articol tratează problema autoanticorpilor față de macromoleculele nucleare și citoplasmatice, care pot fi puși în evidență în bolile autoimune. Tot aici se discută și asocierea acestor autoanticorpi cu unele antigene de histocompatibilitate, precum și valoarea lor pentru diagnostic.

În volum este inclus și un articol privind infecțiile pe care le produc speciile microbiene puțin virulente la bolnavi care prezintă disfuncții ale fagocitelor. Astfel, sindromul de hiperimunogamaglobulinemie E cu tulburări ale chemotaxiei granulocitelor și scăderea reactivității celulare poate fi asociat cu infecții determinate de *Candida* și cu erupții cutanate eczematoide. O situație asemănătoare se întîlnește și în acrodermatita enteropatică, în ihtioză etc.

Disfuncțiile limfocitare din micozisul fungoid și din limfomul cu celule T sînt asociate cu reducerea răspunsului chemotactic al monocitelor și scăderea rezistenței la infecțiile bacteriene. Produșii limfocitelor T maligne pot compromite activitatea fagocitelor monocitare, fenomen care survine și în unele viroze (herpes, gripă).

Este de asemenea menționată existența unor inhibitori serici ai diapedezei și chemotaxiei leucocitare în diferite alte boli (ciroză hepatică, boala Hodgkin, sarcoidoză, lepra lepromatoasă), fiind considerat și rolul produșilor de inflamație. Se subliniază importanța tratamentului antiinfecțios în aceste condiții.

Prin cumularea datelor asupra fenomenelor imune ce au loc în bolile dermatologice, prin accentuarea noilor aspecte în imunopatologie, cartea este de un deosebit interes atît pentru dermatologi cît și pentru imunologi.

Prin noutatea și diversitatea problematicii prezentate, volumul poate sta la baza unor cercetări viitoare în ambele domenii, dermatologie și imunologie, nume ca Müller-Eberhardt fiind chezășia nivelului științific deosebit de ridicat al cărții.

Despina Mateescu

A. DORN, H.-G. BERNSTEIN, *Laborpraxis der Immunohistochemie* (Practică de laborator de imunohistochimie), VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1983, 128 p., 33 fig., 9 tabele

Sensibilitatea și specificitatea ridicată, precum și metodologia relativ simplă au contribuit hotărîtor la o aplicare tot mai largă a metodelor imunohistochimice nu numai în cercetările fundamentale legate de aspecte morfologice de interes pentru biologie și medicină, ci și în practică, cum este, de pildă, diagnosticul histopatologic.

Bazați pe o bogată experiență practică, autorii au elaborat prezentul manual, care vrea să fie un îndreptar pentru activitatea zilnică desfășurată într-un laborator de imunohistochimie. Materialul este foarte bine sistematizat, ilustrat cu numeroase reprezentări schematizate ale diferitelor tipuri de reacții de cuplare și marcare, specifice pentru domeniul tratat și scris într-o limbă foarte clară și concisă. Utile pentru practician sînt și tabelele sinoptice și reproducerile unor fotografii de preparate histochimice obținute prin tehnicile descrise.

După un capitol introductiv privitor la bazele biologice ale reacției imune și după prezentarea, în cel de-al doilea capitol, a metodelor specifice de identificare calitativă și cantitativă a antigenelor și anticorpilor, autorii tratează în capitolele următoare imunofluorescența, tehnici imune cu complecși metalici, tehnica imunoenzimatică cu imunoglobuline marcate și nemarcate, procedeele radioimunohistochimice și, în sfîrșit, folosirea lectinelor la identificarea antigenelor de suprafață. Un scurt articol este dedicat perspectivelor imunohistochimiei. Fiecare capitol este tratat ca o entitate, începînd cu bazele biologice și principiile de reacție, urmînd apoi procedeele practice de efectuare a tehnicii respective și încheindu-se cu aspecte legate de interpretare, specificitate, aplicări și exemple.

Un index alfabetic de literatură selectivă pentru aprofundarea diferitelor aspecte tratate în carte și de literatură citată în text, precum și un index alfabetic pe subiecte completează în mod util acest manual practic de laborator, care se adresează unui cerc larg de specialiști din cercetarea fundamentală și practica medicală.

Horst D. Schell

R. MEYER, H. WALLER (sub red.), *Zellkulturen in der medizinischen Diagnostik und Forschung* (Culturi de celule în diagnosticul medical și în cercetare), VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1984, 143 p.

Volumul de față, al 44-lea din seria „Ergebnisse der experimentellen Medizin" (Rezultate ale medicinii experimentale), editat cu ocazia împlinirii a 20 de ani de la înființarea Organizației cultivatorilor de celule din R.D.Germană, are ca scop să informeze pe cititor — pe baza a 11 articole selecționate de editori — asupra nivelului și preocupărilor actuale din R.D.G., în acest domeniu punîndu-se un accent deosebit mai ales pe importanța practică ce revine culturii de celule în diagnosticul și terapia atît în cadrul medicinii, cît și în cel al medicinii veterinare.

Din materialul prezentat rezultă că cultura de celule și-a dobîndit și ocupă un loc important în medicină și în biologie. Există o serie de afecțiuni, mai ales perturbații metabolice congenitale, care în prezent nu pot fi diagnosticate cert fără a se apela la culturi de celule. În plus, culturile de celule au o importanță deosebită în obținerea de vaccinuri și sînt totodată un ajutor prețios în cercetarea biologică și medicală fundamentală. Astfel, o serie de articole prezentate în volumul de față se referă la ajutorul pe care îl dau culturile de celule în diagnosticul perturbațiilor metabolice congenitale, în diagnosticul prenatal al defectelor genetice, în diagnosticul viral și în diagnosticul citogenetic al malformațiilor umane. Alte articole se referă la culturile de celule și țesuturi ca model în studiul acțiunii citostaticelor, în descifrarea patogeniei bolilor vasculare sau în cercetarea experimentală a diabetului. De amintit și articolul referitor la folosirea culturilor de celule în prepararea de vaccinuri antivirale, precum și cel cu privire la comportarea celulelor umane în culturi de lungă durată.

Articolele sînt foarte concise, bine sistematizate, bogate în ilustrații și tabele și se încheie, fiecare în parte, cu indicații bibliografice și cu adresa exactă a primului autor.

Volumul de față se încheie, ca și celelalte volume din această serie, ca un index alfabetic pe subiecte.

Horst D. Schell

E. GÜNTHER, *Lehrbuch der Genetik* (Manual de genetică), ed. a IV-a revizuită, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1984, 485 p., 323 fig., 12 planşe şi 54 tabele

Avînd la bază o îndelungată experienţă didactică şi de cercetare ştiinţifică, autoarea a reuşit să elaboreze o introducere modernă în bazele genetice clasice şi moleculare, ţinînd seama în această ediţie şi de cele mai recente descoperiri ale cercetării genetice. Prezentul manual, foarte bine sistematizat, scris într-un limbaj accesibil şi scos în condiţii grafice ireproşabile, oferă studenţilor în biologie, medicină şi agronomie, precum şi tuturor celor interesaţi de genetică cunoştinţele de bază din acest domeniu atît de important pentru cercetarea fundamentală şi practică, într-o continuă şi rapidă dezvoltare.

Materialul prezentat este sistematizat în şase părţi cu 25 de capitole. După un scurt capitol introductiv privitor la obiectul geneticii şi la procesele fundamentale implicate în ereditate, în partea I autoarea prezintă structura chimică a materialului genetic şi citologia structurilor ce conţin ADN. Partea a II-a tratează replicarea şi repartizarea materialului genetic, iar partea a III-a acţiunea genelor. Partea a IV-a este consacrată mutaţiilor şi se referă la mutaţii de gene, de cromozomi şi de ploidie. Partea a V-a prezintă recombinaţii în două capitole, unul referitor la recombinaţia intercromozomală, iar celălalt la recombinaţia intracromozomală. Cea de-a VI-a şi ultima parte, care cuprinde cele mai multe capitole (12 din 25), se referă la recombinaţiile legate de procese parasexuale, tratînd o serie de aspecte importante, ca procesele parasexuale la eucariote, recombinaţia la fagi, transformaţia, transducţia, plasmide şi conjugarea bacteriilor, ADN recombinat, imunogenetica, genetica populaţiilor, aplicarea geneticii în creşterea plantelor de cultură ş.a.

Iconografia extrem de bogată, numeroasele formule, scheme de reacţie şi tabele uşurează mult înţelegerea datelor prezentate. De remarcat şi bibliografia amplă, de 570 de articole şi cărţi citate din literatura de specialitate. Un index alfabetic pe subiecte încheie în mod util acest valoros manual.

Horst D. Schell

MARCELA ZAMFIRESCU-GHEORGHIU, *Tendinţe şi direcţii de dezvoltare în biochimia medicală*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1983, 176 p., 56 fig.

Lucrarea se încadrează în contextul preocupărilor moderne care abordează fondul interrelaţiilor biochimiei cu diferite domenii ale ştiinţelor biomedicale.

Cartea este structurată în două părţi. Partea I este dedicată problematicii de fond a biochimiei medicale, expusă într-o viziune integrativ-funcţională; cuprinde şase capitole, abordînd aspecte referitoare la corelaţii structuri-funcţii chimice şi biologice, cu accent deosebit pe organizarea chimică şi fiziologică a ultrastructurilor celulare, structura spaţiotemporală a biosistemelor, metode fundamentale de calcul cuantic, procese cu transfer de sarcină în biosisteme, biochimia radicalilor liberi, mecanisme de reglare şi control ale vieţii celulare şi bazele moleculare ale unor procese metabolice normale şi patologice. Partea a II-a este consacrată aspectelor de metodică şi raţionalizare în analiza biochimică medicală; cuprinde patru capitole privind modelarea biosistemelor la nivel molecular, metodele moderne de investigare biochimică (sensori enzimatici, RIA, ELISA etc.). Ultimul capitol prezintă concepţia autoarei privind direcţiile de raţionalizare a activităţilor în laboratoarele de biochimie medicală. O atenţie deosebită este acordată aspectelor referitoare la selectarea şi aplicarea metodelor biochimice de investigaţie potrivit scopurilor, utilităţii şi sensibilităţii dorite.

Lucrarea, cuprinzînd o mare diversitate de informaţii, reprezintă o chemare pentru tratarea aspectelor aplicative de biochimie clinică la un nivel fundamental elevat. Din această unitate rezultă abordarea responsabilă a problemelor de prognoză a direcţiilor de dezvoltare în biochimia clinică.

Redactată într-un stil atractiv cu reprezentări grafice elegante şi sugestive, lucrarea prezintă un interes deosebit atît pentru biochimişti, cît şi pentru medici şi biologii din reţeaua sanitară, precum şi pentru cadrele de cercetare din instituţiile de profil biomedical.

Mircea-Alexandru Mateescu

IARC Scientific Publications No. 48 : *Cancer Incidence in the USSR* (Publicațiile științifice IARC nr. 48 : „Incidența cancerului în U.R.S.S."), a doua ediție revizuită, editată în U.R.S.S. de N.P. Wapalkov, G. F. Tserkovny, V.M. Merabishvili și la Lyon de D.M. Parkin, M. Imans, C.I. Muir, 1983, 75 p.

Acest volum se înscrie în cadrul publicațiilor IARC, în programul de cercetări consacrat în special epidemiologiei cancerului.

Autorii adoptă modul de prezentare a monografiilor asupra „Incidenței cancerului în 5 continente", publicate de IARC, evidențiind statistica neoplasmului în funcție de vîrstă, sex și regiune pentru cele 15 republici ale U.R.S.S. Pentru fiecare republică este făcută o scurtă descriere din punct de vedere geografic și etnografic, urmată de media incidenței anuale între anii 1969 și 1971.

Volumul se adresează și este de cel mai mare interes pentru specialiștii din domeniu și pentru statisticienii epidemiologi.

Ștefana Mogoș

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 31 : *Some Food Additives, Fees Additives and Naturally Occuring Substances* (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic al substanțelor chimice la om, vol. 31 : Unii aditivi alimentari, aditivi de îngrășare și substanțe găsite în natură), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1983, 316 p.

Volumul sintetizează lucrările sesiunii care a avut loc în perioada 19—26 octombrie 1982 la Lyon privind evaluarea riscurilor carcinogenice la om pe care le prezintă unii aditivi alimentari sau aditivi de îngrășare, fie obținuți sintetic, fie extrași din diferite surse biologice.

Lucrarea este cu atît mai importantă pentru cei interesați cu cît se constată o creștere a numărului cazurilor de cancer cu etiologie presupus a fi datorată aditivilor alimentari (coloranți, antioxidanți, conservanți, aromatizanți) sau aditivilor administrați pentru sporul de carne și care se regăsesc în produsele de consum.

Fiecare produs este studiat în patru secțiuni : date chimice și fizice despre produs (1), producția comercială, folosire, analiză (2), date relevante asupra evaluării riscului carcinogenetic la oameni (3), o evaluare a datelor publicate despre produs (4).

Printre lucrările publicate în acest volum se numără cele despre flavonoide, produși de piroliză izolați din alimente, despre colesterol și derivații săi metabolici (extrem de importantă prin incidența acestui produs în alimentația zilnică), despre furazolidină, gyrnitrină, agaritină.

Despina T. Constantin

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 32 : *Polynuclear Aromatic Compounds* : Part I : *Chemical, Environmental Data* (Monografiile IARC asupra evaluării riscului carcinogenic al substanțelor chimice la om, vol. 32 : Compuși aromatici polinucleari, partea I : Date chimice de mediu și experimentale), Lyon, International Agency for Research on Cancer, 1983, 482 p.

Evaluarea riscului carcinogenic asociat compușilor aromatici polinucleari este subiectul volumului în discuție. Acești compuși vor fi abordați și în următoarele trei volume ale seriei.

În acest volum sînt prezentate studiile experimentale asupra activității carcinogenetice a compușilor individuali. Se descriu 48 de hidrocarburi aromatice polinucleare și compuși heterociclici înrudiți, printre are se numără antracenul, antantrenul, 1,2- și 3,4-benzacridina, 3,4-benzofluorenul, 2, 3, 4, 6-dibenzofluorantrenul etc.

În realitate, organismul uman este supus acțiunii unor amestecuri complexe de substanțe aromatice. Această acțiune asupra animalelor de experiență va fi prezentată în următoarele trei volume.

În monografiile individuale sînt cuprinse scurte descrieri despre metaboliți cunoscuți ai compușilor aromatici polinucleari și activitatea lor biologică. De asemenea, volumul redă o vedere generală asupra metabolismului compușilor aromatici polinucleari.

Despina T. Constantin

Zellrezeptoren für Neurotransmitter, Peptid- und Steroidhormone und Toxine (Receptori celulari pentru neurotransmițători, hormoni peptidici și steroizi și toxine), editor PH. V. HEITZ, Acta histochemica, Supplementband XXIX, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1984, 189 p., 91 fig., 18 tabele

Volumul este dedicat prezentării materialelor susținute la al XXIX Simpozion al Societății germane de histochimie, organizat la Gargellen (Austria) în perioada 22—25 septembrie 1982.

În fiecare an, Societatea germană de histochimie acordă premiul „Robert Feulgen" unei lucrări originale sub raport teoretic și tehnic, În 1982, cîștigătorul a fost J. Roth, inițiatorul unei metode originale de detectare în secțiunile tisulare, la nivel optic și ultrastructural, a antigenelor cu ajutorul proteinei A cuplate cu aur. Urmează o lucrare foarte interesantă privind caracteristicile histochimice și semnificația receptorilor celulari în biologie și patologie, datorată unui cercetător încununat anterior cu un premiu asemănător, W. Strumpf.

Un grup de două lucrări se ocupă de problema localizării receptorilor pentru neurotransmițători și medicamente cu ajutorul metodei autohistoradiografice. Aspecte particulare ale localizării receptorilor pentru hormonii peptidici și steroizi sînt tratate în alte patru articole, deosebit de interesante. Un alt grupaj tematic se referă la receptorii toxinelor. Volumul cuprinde, în ultima sa parte, o serie de 15 rezumate „varia", care completează unele detalii tehnice sau de interpretare legate de receptorii tisulari.

Articolele sînt prezentate în limbile engleză și germană. Fiecare lucrare este bogat ilustrată și completată cu o bogată bibliografie. Condițiile grafice sînt excelente.

Datorată unor biochimiști și histochimiști de mare prestigiu, culegerea de față aduce date noi în problema foarte actuală a receptorilor celulari pentru neurotransmițători și hormoni, fiind deosebit de utilă fiziologilor, fiziopatologilor, neurobiologilor și histochimiștilor.

Aurelia Bordeianu

Möglichkeiten und Grenzen praktisch-diagnostischer Zyto- und Histochimie (Posibilități și granițe ale diagnosticului cito- și histochimic în practică), editor F. W. RATH, Acta histochemica, Supplementband XXX, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1984, 389 p., 251 fig., 43 tabele

Volumul conține materialele prezentate la Simpozionul Societății germane de topochimie și microscopie electronică, ținut la Halle (R.D.G.) în octombrie 1982. Prezentate în limbile germană și engleză, cele 49 de lucrări, aportul unor nume prestigioase ale histochimiei, încearcă să stabilească posibilitățile, limitele și perspectivele histochimiei în practica diagnosticului anatomopatologic. O analiză completă a tuturor articolelor fiind imposibilă, vom prezenta cîteva lucrări mai deosebite.

Z. Lojda insistă asupra importanței studiului histochimiei proteazelor în cunoașterea patologiei intestinale, a aterosclerozei, a maladiilor hematologice. Într-un alt studiu, același autor se ocupă de diagnosticul diferențial al sindroamelor de malabsorbție cu ajutorul histoenzimologiei. F.W. Rath analizează, într-un studiu foarte amplu, avantajele enorme oferite de histochimie în stabilirea diagnosticului unor maladii „in vivo" (biopsii hepatice, intestinale, renale, musculare etc.), ca și în elucidarea unor procese morbide pe materiale necroptice. Ph. V. Heitz relevă progresele realizate în ultimii ani cu ajutorul imunohistochimiei (identificarea imunoglobulinelor, a unor hormoni, enzime, antigene diverse) în înțelegerea unor sindroame patologice.

O serie de 4 lucrări se ocupă de histochimia mușchilor scheletici, cu ajutorul unei iconografii demonstrative și de referință. Se mai trec în revistă metodele utilizate în diagnosticul tumorilor, al bolilor renale, al suferințelor hematologice. Se prezintă și unele tehnici foarte noi, demonstrîndu-se utilitatea lor în practica anatomopatologică: fotometrie, microelectroforeză, fluorescență, autohistoradiografie, microscopie electronică și de baleiaj etc.

Ilustrațiile, alb-negru și color, și condițiile grafice sînt excelente.

Volumul, rod al bogatei experiențe a unor cercetători de renume, demonstrează avantajele metodelor histochimice în practica diagnosticului anatomopatologic. Pe de o parte, se insistă asupra necesității de a se utiliza metode strict standardizate și comparabile, iar pe de altă parte se relevă că o serie de investigații rămîn încă apanajul unor laboratoare foarte specializate, dotate cu aparatură deosebită, în mîna unor cercetători cu mare experiență.

Cartea prezintă un interes deosebit pentru anatomopatologi, histochimiști și pentru toți cei ce lucrează în domeniul morfologiei clinice sau experimentale.

Aurelia Bordeianu

LASZLO ZABORSZKY, *Afferent Connections of the Medial Basal Hypothalamus* (Conexiuni aferente hipotalamusului medial bazal), în *Advances in Anatomy, Embriology and Cell Biology*, vol. 69, Springer-Verlag, Berlin—New York, 1982, 80 p.

Lucrarea reprezintă de fapt o excelentă monografie a problemei, concentrată logic și sistematic și ilustrată cu diagrame originale, fotomicrografii și electronomicrografii de impecabilă calitate.

Remarcabil specialist în domeniu, autorul, pe baza unei imense bibliografii și a propriilor investigații, îndelungi și perseverente, ne oferă date clare, concise, de reală valoare și inedite privind cunoașterea și interpretarea acestor — încă precar descifrate — aferențe ale hipotalamusului medial bazal.

Conjugînd studiul fotonic și electronic al degenerării aferențelor cu metode histochimice și biochimice de mare finețe, autorul își propune — și reușește în mod magistral — să elucideze numeroase și dificile fațete ale acestui deosebit de complex sistem. Astfel, monografia ne pune la dispoziție noi achiziții în problemă:

— Aferențele hipotalamusului medial bazal ajung aici pe trei căi principale: sistemul substanța cenușie centrală—sistemul periventricular, fasciculul medial telencefalic și decusația supraoptică, toate conținînd atît fibre aminergice cît și nonaminergice.

— Noradrenalina, prezentă atît în nucleii eminenței mediane cît și în cei ai hipotalamusului medial bazal, provine din axonii ascendenți ai grupelor celulare noradrenergice pontomedulare.

— Adrenalina hipotalamică își are originea în cea mai mare parte în nucleul medular reticular lateral și în mai mică măsură în nucleul tractusului solitar.

— Dopamina are parțial origine extrahipotalamică.

— Serotonina provine din nucleul dorsal și în mai mică măsură din nucleii serotoninergici central superior și pontin.

— Fibrele nonaminergice pleacă din nucleul peripeduncular și din substanța cenușie centrală, arborizația terminală a acestor fibre deținînd o strictă dispozitie topografică.

— Structurile limbice și amigdala proiectează în hipotalamusul medial bazal fibre care diferă atît cantitativ cît și calitativ.

— Majoritatea aferențelor eminenței mediane au origine intrahipotalamică, îndeosebi în nucleii arcuat, periventricular și paraventricular: o mică parte din fibre provin însă și din nucleii ariei retrochiasmatice, din nucleii hipotalamici posteriori și preoptic și din grupele celulare monoaminergice din trunchiul cerebral.

În concluzie, hipotalamusul medial bazal formează o adevărată rețea neuronală complexă, construită din unități integrative (similare celor din cortex și cerebel) răspunzătoare de procesul ierarhizării secvențiale a unei mari cantități de informație, care sosește aici într-o manieră topografică organizată pentru a fi transformată în semnale pentru eminența mediană, trunchiul cerebral și centrii spinali autonomi.

Este de prisos a recomanda lucrarea celor interesați, deoarece ea se impune de la sine prin valoarea datelor avansate cu indiscutabilă rezonanță în cercetarea fundamentală și nu mai puțin în clinica neurologică.

Florica Mailat

EDMUND KERPEL-FRONIUS, *The Pathophysiology of Infantile Malnutrition. Protein-Energy Malnutrition and Failure to Thrive* (Patofiziologia subnutriției la copii. Subnutriția protein-energetică și stagnarea în creștere), Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1983, 312 p., cu figuri și tabele

Scopul acestei lucrări este de a compara diferite tipuri de subnutriție, de a identifica caracteristicile comune fiecărui tip, precum și pe cele datorate diferiților factori, printre care cei ecologici. Volumul încearcă de asemenea să pună de acord diferitele teorii, adeseori contradictorii, asupra patofiziologiei subnutriției. Autorul relevă faptul că specialiștii utilizează unii termeni în diferite accepțiuni.

Studiul de față se bazează pe literatura din ultimii 20 de ani, precum și pe datele obținute în unele țări în curs de dezvoltare.

După un capitol consacrat definiției și nomenclaturii, autorul se ocupă de posibilitățile și metodele de evaluare a subnutriției, inclusiv în cazurile foarte severe, iar în capitolul următor

de manifestările clinice ale diferitelor tipuri de subnutriție. Dintre acestea sînt abordate formule hipoalbuminice și formule uscate, fără hipoalbuminemie, privind țările în curs de dezvoltare, precum și deficiențele de creștere din țările dezvoltate.

Următoarele capitole studiază relațiile dintre diverse tipuri de subnutriție și unele aspecte fiziopatologice, cum ar fi infecțiile, diareea, metabolismul bazal, termoreglarea, hemodinamia și circulația, funcția virală, respirația, conținutul și distribuția apei și hiponatremia. De remarcat că în aceste capitole este abordată atît problematica adulților cît și a copiilor. Relația dintre aceste forme de subnutriție și concentrația unor ioni de K, Mg, Fe, Zn etc., adeseori controversată, este discutată în următoarele trei capitole. Implicațiile metabolismului proteic, lipidic și glucidic în diferitele forme de subnutriție sînt abordate în capitolele următoare.

În continuare, un rol important se acordă corelației dintre glandele endocrine și diferitele forme de subnutriție. Două capitole privind cauzele imediat posibile ale decesului, unii factori de prognoză, relația subnutriției cu comportarea, performanțele intelectuale și motorii încheie această trecere în revistă, de un interes deosebit pentru medicii specialiști în nutriție și pediatrie.

Abordarea subnutriției cu diversele ei aspecte recomandă lucrarea ca o eficientă introducere în această problematică.

Magdalena Lungu

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel ştiinţific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : *Viaţa ştiinţifică*, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : 78200 — Bucureşti 2, P.O.B. 2—2.

ÎN EDITURA ACADEMIEI A APĂRUT:

CORNEL BODEA (coordonator), **Tratat de biochimie vegetală,** partea a II-a: **Compoziția chimică a principalelor plante de cultură,** vol. V: GEORGETA ENĂCHESCU, **Legumele,** 1984, 438 p.

Volumul tratează în mod complex 56 de specii de legume cultivate la noi în țară, fiind abordate compoziția chimică și modificările ce survin ca rezultat al condițiilor climatice diferite, tehnologia de cultură, posibilitățile de modificare genetică, ameliorarea soiurilor, perioadele optime de valorificare.

Sînt menționate posibilitățile de îmbunătățire a însușirilor productive legate de precocitate, rezistența la boli și dăunători, rezistența la diferiți factori de stress etc.

Aceste aspecte conferă lucrării o importanță aplicativă deosebită pentru un cerc larg de cititori din producție și cercetare: biochimiști, legumicultori, profesori și studenți din învățămîntul superior de profil, cadre din industria alimentară și de valorificare a legumelor, medici nutriționiști, biologi, farmaciști etc.

1984 NOV 3 0

RM—ISSN 0049—2396

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 27, NR. 2, P. 107—202, BUCUREȘTI, IULIE—DECEMBRIE 1984

c. 2449 „I. P. Informația" 43816 Lei 30